



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**FOTOPROTEKTIVNÍ VLASTNOSTÍ PHB GRANULÍ**

PHOTOPROTECTIVE PROPERTIES OF PHB GRANULES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Ondrej Hesko

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1139/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Ondrej Hesko**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Fotoprotektivní vlastností PHB granulí

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma možných mechanismů ochrany prokaryotických buněk proti UV záření.
2. Navrhnout a optimalizovat způsob izolace intracelulárních PHB granulí z buněk.
3. Navrhnout a realizovat sérii experimentů za účelem posouzení mechanismu interakce izolovaných granulí s UV zářením.
4. Navrhnout a realizovat sérii experimentů za účelem posouzení přítomnosti PHB granulí v buňce na interakci UV záření s buněčnou DNA.
5. Diskutovat získané experimentální poznatky v kontextu potenciálních fotoprotektivních účinků intracelulárních PHB granulí.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Ondrej Hesko  
student(ka)

-----  
Ing. Filip Mravec, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Cílem práce je studium a návrh fyzikálně-chemické metody na ověření fotoprotektivních vlastností PHB granulí pomocí bakterie *Cupriavidus necator* H16 a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> lišící se schopností produkce polyhydroxyalkanoátů. V teoretické části jsou zpracované základní informace ku polymerním agregátů a metodám využitých při zkoumání fotoprotektivity. Byli optimalizovány metody jako nefelometrie a kontinuální fluorescenční mikrofotolýza (CFM) sloužící k charakterizaci mechanismu způsobu interakce světla s granulemi. V experimentální části byly stanovovány rozptylové vlastnosti bakterií a získány charakteristické křivky. Dále byla porovnávána fotostabilita fluorescenční sondy specifická pro nukleové kyseliny v bakteriích. Tato metoda měla dokázat větší odolnost vůči UV světlu kmenu H16. Zadefinovala také možnou interakci nukleových kyselin a zkoumaných granulí

## KLÍČOVÁ SLOVA

*Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, PHB granule, fotoprotektivita, rozptyl světla, fluorescence

## ABSTRACT

The objective of this work is study and design of physical-chemical methods for verification of photoprotective properties PHB inclusions using bacteria *Cupriavidus necator* H16 and its mutated bacteria strain *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> which differs in production capability of polyhydroxyalkanoates. Basic information about of polymer inclusions and methods used for proving photoprotectivity are discussed in theoretical part. Methods such as nephelometry and continous fluorescence microphotolysis (CMF), which is used to characterize the mechanism of interaction of light with inclusions, were optimized. In experimental part properties of light scattering in bacteria were determined and characteristic curves were obtained. Further the photostability of fluorescence probe specific for nucleic acids were compared in bacteria strains. This method should prove bigger tolerance of bacteria H16 for UV light. It should also define possible interaction of nucleic acids with PHB inclusions.

## KEYWORDS

*Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, PHB inclusions, photoprotectivity, light scattering, fluorescence

HESKO, Ondrej *Fotoprotektivní vlastnosti PHB granulí*: semestrální projekt. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2017. 50 s. Vedoucí práce byl Ing. Filip Mravec, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svůj semestrální projekt na téma „Fotoprotektivní vlastnosti PHB granulí“ jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího semestrálního projektu a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor(ka) uvedeného semestrálního projektu dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto semestrálního projektu jsem neporušil(a) autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl(a) nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom(a) následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno .....

.....

podpis autora(-ky)

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce panu Ing.Filipovi Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci. Dále bych rád poděkoval Ing.Petrovi Sedláčkovi,Ph.D. za konzultace a cenné rady potřebné pro vypracování bakalářské práce. Další velké poděkování patří Ing. Eve Slaninové za pomoc při řešení experimentální části a její odbornou pomoc při psaní bakalářky.

Brno .....

.....

podpis autora(-ky)

# OBSAH

Úvod	10
<b>1 Teoretická část</b>	<b>11</b>
1.1 Polyhydroxyalkanoáty	11
1.1.1 Poly(3-hydroxybutyrát)(P3HB)	11
1.1.2 Struktura PHA granulí	12
1.1.3 Biosyntéza PHA granulí	13
1.1.4 <i>Cupriavidus necator</i>	14
1.2 Rozptyl světla	15
1.2.1 Elastický rozptyl světla	16
1.2.2 Rozptyl světla v koloidních soustavách	17
1.2.3 Nefelometrie	17
1.3 Luminiscence	18
1.3.1 Jablůnského diagram	19
1.3.2 Franck-Condonův princip	20
1.3.3 Charakteristiky fluorescence	21
1.3.4 Fluorescenční sonda - propidium jodid	22
1.3.5 Zhašení fluorescence	23
1.3.6 Fotovybělování(photobleaching)	24
1.3.7 Kontinuální fluorescenční fotovybělování (CFM)	24
<b>2 Experimentální část</b>	<b>27</b>
2.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje	27
2.1.1 Použité bakterie	27
2.1.2 Použité chemikálie	27
2.1.3 Přístrojové vybavení	27
2.2 Kultivace	28
2.2.1 Uchovávání bakteriálních kultur a příprava inokula	28
2.2.2 Živná média	29
2.2.3 Izolace PHB granulí z kmene <i>Cupriavidus necator</i> H16	30
2.3 Charakterizace rozptylových vlastností PHB granulí	31
2.3.1 Stanovení rozptylových vlastností bakteriálních kmenů a izolovaných granulí	31
2.3.2 Stanovení sedimentační řady bakteriálních kmenů a izolovaných granulí	32
2.3.3 Stanovení počtu buněk bakteriálních kultur <i>Cupriavidus necator</i> H16 a PHB <sup>-4</sup>	32

2.3.4	Stanovení obsahu PHB v biomase . . . . .	32
2.4	Příprava vzorků pro Kontinuální fluorescenční mikrofotolýzu (CFM) .	33
<b>3</b>	<b>Výsledky studentské práce</b>	<b>34</b>
3.1	Charakterizace a optimalizace vlastností vzorků . . . . .	34
3.1.1	Sedimentační řada . . . . .	34
3.1.2	Počet buněk bakteriálních kultur <i>Cupriavidus necator</i> . . . . .	36
3.1.3	Stanovení PHA v biomase . . . . .	37
3.2	Rozptylové charakteristiky . . . . .	38
3.3	Kontinuální fluorescenční mikrofotolýza . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Závěr</b>	<b>46</b>
	<b>Literatura</b>	<b>48</b>

# SEZNAM OBRÁZKŮ

1.1	Chemická struktura většiny PHA bakterií. PHA je obvykle zložená z (R)- $\beta$ -hydroxy mastných kyselin, kde R může být methyl (C1) až tridecyl (C13) [3]	11
1.2	Model ukazující možnou strukturu PHA granulí a její asociaci se specifickými proteiny [9]	13
1.3	Syntéza a degradace poly(3-hydroxybutyrátu) - PHB cyklus	13
1.4	Transmisní elektronový mikroskop tenké vrstvy <i>R.eutrophy</i> obsahující velké množství granul [7].	15
1.5	Porovnání Rayleighova rozptylu s rozptylem Mieovým, kde dochází k interferenci rozptýleného světla v různých směrech [13].	16
1.6	Porovnání turbidimetrie a nefelometrie jako metody pro měření rozptylu světla [14]	18
1.7	Jablonského diagram ilustrující procesy probíhající ve fyzikálních systémech při fluorescenci a fosforescenci	20
1.8	Struktura molekuly propidium jodidu	23
1.9	Vyhasínací křivka pro speciální parametry, kdy pro A $k_{off} = 0\text{ s}^{-1}$ , bez výměny fluoforu z okolí a pro případ B $k_{off} = 0,05\text{ s}^{-1}$ [23]	25
1.10	Vybělovací křivky pro fluofory s disociační konstantou pro C $k_{off} = 0,2\text{ s}^{-1}$ a pro D $k_{off} = 6\text{ s}^{-1}$ [23]	25
3.1	Časová závislost absorpance suspenzí buněk <i>Cupriavidus necator</i> H16 o různé optické hustotě.	34
3.2	Časová závislost absorpance izolovaných granul o různé optické hustotě.	35
3.3	Časová závislost absorpance suspenzí buněk <i>Cupriavidus necator</i> PHB <sup>-4</sup> o různé optické hustotě.	35
3.4	Snímek bakterií na Bürkerově komůrce	37
3.5	Obsah polyhydroxybutyrátu v biomase	38
3.6	Porovnání rozptylových vlastností bakteriálních kmenů <i>C.necator</i> H16, PHB <sup>-4</sup> a izolovaných P3HB granul	39
3.7	Snímky bakterie <i>C.necator</i> H16 po fotovybělení celého objemu buňky.	42
3.8	Zvolené místa v bakteriích při bodovém fotovybělování propidium jodidu	43
3.9	Charakteristické vybělovací křivky pro bakterii H16	43
3.10	Charakteristické vybělovací křivky pro bakterii PHB <sup>-4</sup>	43
3.11	Anomálie při měření CFM křivek v buňkách H16, vypovídající o složitosti systému bakterie s PHB granulemi a interpretaci dat	44
3.12	Anomálie při měření CFM křivek v buňkách PHB <sup>-4</sup> , vypovídající o složitosti systému bakterie bez granulí a interpretaci dat	45



## SEZNAM TABULEK

2.1	Složení agarového média . . . . .	29
2.2	Složení minerálního média . . . . .	29
2.3	Složení *roztoku stopových prvků . . . . .	29
2.4	Složení PBS pufru . . . . .	30
2.5	Složení Tris-HCl pufru (ph=8): . . . . .	31
2.6	Složení fosfátového pufru (pH=7,4): . . . . .	31
3.1	Počet buněk v jednotlivých čtvercích pro bakteriální kultury <i>Cupriavidus necator</i> H16 a PHB <sup>-4</sup> . . . . .	36
3.2	Výsledky počtu buněk kultur <i>Cupriavidus necator</i> H16 a PHB <sup>-4</sup> . . .	36
3.3	Procentuální zastoupení PHB v biomase . . . . .	37

# ÚVOD

Život na Zemi je všudypřítomný. Dokazují to odolné mikroorganismy – bakterie, které jsou schopny adaptace v oblastech od mořského dna, termálních vodám až po polární pás. V rozmanitém prostředí jsou tyto živé systémy vystaveny různým, často nepříznivým podmínkám. Nicméně se tyto mikroorganismy naučili snášet různorodé stresy prostředí a využívat je ke svému prospěchu. V dobách, kdy se vyvíjel život na Zemi, kdy živé systémy byly založeny na anaerobních procesech, byl život odlišný od dnešního světa jako ho známe. Teplota zemského povrchu byla asi 70-100 °C, voda byla silně kyselá, atmosféra měla slabě redukční charakter, kde největší zastoupení mělo  $CO_2$  a  $N_2$ . Největší zátěž pro vznik složitějších organismů bylo ultrafialové záření, které pro nedostatek kyslíku v ovzduší, nemohlo být cloněné ozonem. Proto existuje předpoklad, že některé bakterie syntetizovaly polymer – poly3hydroxybutyrát ve formě granulí, které nesplnovaly pouze zásobní význam. Tento polymer, mimo jiné, slouží i při zvládnutí stresových faktorů, jako jsou změna optimálních hodnot pro život systému, například teploty, pH a osmotické rovnováhy. Jednou z dalších rolí polymeru je ochrana důležité biomolekuly před oxidací, kdy omezuje aktivitu kyslíkových radikálů. Předpokládá se, že bakterie využívají polymer jako fotoprotektant vůči UV světlu. Důvodem syntézy tohoto poly3-hydroxybutyrátu je ochrana svého důležitého reprodukčního aparátu, zodpovědného za identitu a fungování všech procesů v organismu – DNA (RNA). Uspořádání biomolekuly polyhydroxybutyrátu do větších celků – granulí, mohlo vést k zeslabení intenzity UV záření a tím ochránit DNA před mutacemi a degradací. Fyzikálně-chemický princip ochrany nukleových kyselin a zvýšení fotostability DNA a jiných důležitých biomolekul, může být způsoben absorpcí, nebo rozptylem. Také může ochranovat důležité molekuly před oxidací, kdy interaguje s volnými radikály vzniklými při vystavení systému UV záření.

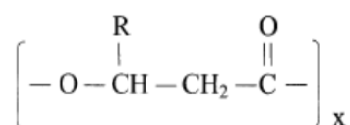
Cílem této práce bylo navrhnout a ověřit využitelnost fyzikálně-chemických metod při vlivu záření na mikroorganismy, a to včetně zavedení a optimalizace metod. Experimentální část byla zaměřena na porovnání bakteriálního kmene produkující PHB granule s bakteriálním kmenem neschopným produkce polymeru. Dalším cílem této práce bylo porovnat samotné granule a jejich vlivu na intenzitě rozptylu světla. Také byla porovnávána fotostabilita interkalační DNA sondy v těchto kulturách. Práce byla zejména zaměřena na způsob snížení intenzity světla zapříčiněná vlivem granulemi polymeru a dokázání samotné fotoprotektivity. Také se zabývala manipulací s kulturami a optimalizací izolace samotných granulí.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxybutyrát je jeden z nejpoužívanějších a nejrozšířenějších polyhydroxyalkanoátů (PHAs), který je syntetizován celou škálou bakterií. Slouží jako zásobárna uhlíku a energie. Polymer je akumulován ve formě ve vodě nerozpustných granulí uložených v cytoplazmě. A zároveň může být tento polymer může být rozložen celou řadou mikroorganismů, které jsou schopny produkovat extracelulární nebo intracelulární depolymerázy [1].

Více než 80 hydroxyalkanoátů bylo nalezeno jako konstitutivní jednotky PHAs, což umožňuje různorodost v mechanických vlastnostech podobajících se vlastnostem krystalického polymeru, nebo elastické gumě, závisící právě na začleněných monomerních jednotkách. Tyto plasty jsou studovány i díky jejich biodegradabilním vlastnostem podobným polypropylenu, kde zatím jejich vysoká cenová náročnost limituje jejich využití ve velké škále aplikací [2]. Zatímco polymer, který bakterie nevyužívají jako rezervní látku, se značí nízkou molekulární hmotností. Byl nalezen v některých bakteriích rodu *Escherichia coli* a jiných organizmech a složí jako složka membrány. PHA zde sehrává úlohu nejspíš v napětově řízených kalciových pump, nebo se zúčastňuje transportu DNA, a nebo protekci makromolekul, na které je navázaný před degradačními enzymy. Molekulární hmotnost PHA se pohybuje od 50,000 – 1,000,000 Da [3].



Obr. 1.1: Chemická struktura většiny PHA bakterií. PHA je obvykle zložená z (R)- $\beta$ -hydroxy mastných kyselin, kde R může být methyl (C1) až tridecyl (C13) [3]

### 1.1.1 Poly(3-hydroxybutyrát)(P3HB)

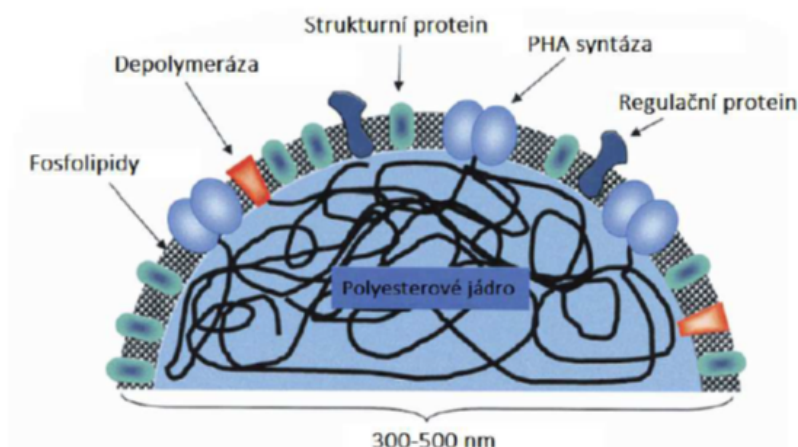
Mezi nejvíc prostudované plasty PHA patří poly(3-hydroxybutyrát), který se skládá z opakujících se opticky aktivních monomerních jednotek kyseliny R-hydroxybutyrové a R-hydroxyvalerátu [4]. Tyto kyseliny jsou všechny v R konfiguraci, což je zapříčiněno stereospecifitou polymerujícího enzymu, PHA syntetázy [7]. Ve své struktuře obsahuje 4 uhlíky a funkční skupinu hydroxykyseliny, kde je nahrazen mimo skupinu karboxylové kyseliny atom vodíku hydroxylovou skupinou [4].

Polyhydroxybutyrát se v přírodě vyskytuje jako vysokomolární PHB a později objevený nízkomolární, který tvoří komplexy s kalcium fosfátem. V organizmech se vyskytuje ve dvou formách, se středně dlouhým řetězcem – s funkcí zásobování organismu, nebo s krátkým řetězcem, který tvoří komplexy s biomakromolekulami, např. s kalcium fosfátem, nebo proteiny, kde sehrává funkci přenašeče iontů. PHB je semi-krystalický polymer se stupněm krystalinity v rozsahu 55 – 85 % a není rozpustný ve vodě. Akumulace a syntéza PHB v mikroorganismech je podmíněna nedostatkem, nebo naopak nadbytkem některých z komponentů (C,H,N,O,P). Biosyntéza se začíná konverzí uhlíkatého substrátu jako glukóza, glycerol, metanol, etanol nebo kyselina octová na acetát, který se v organizmech přenáší pomocí centrálního metabolitu acetylkoenzymu A [5], který je proměněn ve třech základních enzymově katalyzovaných krocích. Finální kompozice polymerového řetězce je determinována uhlíkovým zdrojem, který je dostupný pro organismus z okolí a substrátové specifity PHA syntetázy, enzymem, který polymerizuje jednotky hydroxyacyl-CoA [1]. Nejdříve nastává kondenzace dvou acetyl-CoA jednotek, které formují acetoacetyl-CoA za přítomnosti enzymu acetoacetyl-CoA reduktázy, pak nastává polymerizace PHB polymerázou [6].

### 1.1.2 Struktura PHA granulí

Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polyoxoestery syntetizované početnými bakteriemi a organismy z ve vodě rozpustného 3-hydroxyalkanoyl-CoA. PHA se agregují v cytoplazmě a formují globulární strukturu, nerozpustné granule, které tvoří hydrofobní domény. Při optimálních podmínkách pro růst mají granule v bakterii až 85 % zastoupení v celkové hmotnosti sušiny [8]. Tyto diskrétní rozdělené systémy mají velikost od 200 do 500 nm v průměru, bez které mohou být vizualizované světelnou mikroskopií s fázovým kontrastem, díky jejich velkému lomu světla. Když jsou zkoumané tenké vrstvy bakterií obsahujících PHA pomocí transmisní elektronové mikroskopie, granule se chovají jako elektronově husté jednotky, což je evidentní na 1.4. In vivo PHA granule jsou amorfní, co zabraňuje krystalizaci, má dvě možné vysvětlení. V modelu, ve kterém se pokouší vysvětlit mechanismus polymerizace PHA-syntetázy, se voda taky zúčastňuje řetězové polymerizace. Předpokládá se, že okolo 5-10% vody se nachází v rodících se PHB granulích, což po její odstranění umožňuje polymerním řetězcům se reorganizovat do lamelárních krystalů. Na základě tohoto předpokladu, mohou molekuly vody formovat vodíkové můstky s karbonylovou skupinou polyesteru, který tvoří “pseudo křížové vazby” mezi přilehlými polymerními řetězci. Tento typ molekulárního uspořádání může také vysvětlit amorfní povahu PHA granulí *in vivo* [7]. Izolované granule obsahují z 98 % polyester. Dále se tam nacházejí lipidy, které tvoří dvojvrstvou membránu [8]. Tato membrána má hyd-

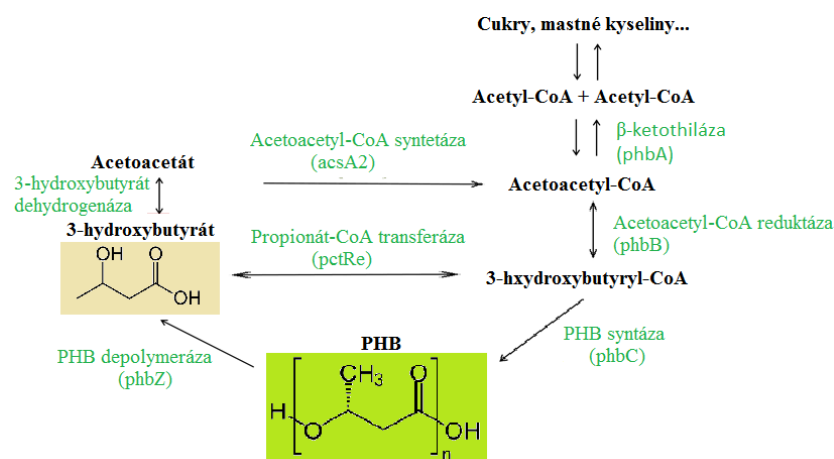
rofilní charakter, čímž akumulace polymeru do granulí nezvýší osmotický tlak v buňce. V membráně jsou také zakomponovány proteiny biosyntézy PHA-syntetázy a degradační intracelulární PHA depolymerázy. Dále se tady nacházejí inkorporované phasiny (PhaP), které jsou zodpovědné za formaci a stabilizaci PHA granulí. Na 1.2 se ukazuje jeden z možných modelů této struktury [8].



Obr. 1.2: Model ukazující možnou strukturu PHA granulí a její asociaci se specifickými proteiny [9]

### 1.1.3 Biosyntéza PHA granulí

Biosyntéza byla zkoumaná na bakterii *Cupriavidus necator*. Mikroorganismus si syn-



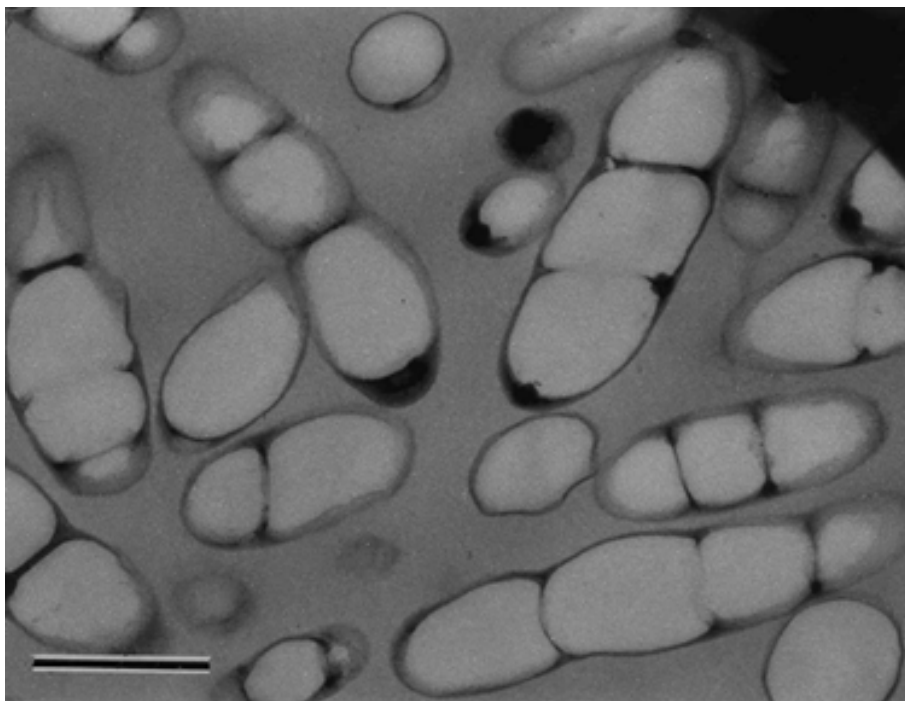
Obr. 1.3: Syntéza a degradace poly(3-hydroxybutyrátu) - PHB cyklus

tetizuje PHB za nepříznivých podmínek pro dělení. Při nadbytku různých zdrojů uhlíku, je v rozličných cyklech proměněn na centrální metabolit acetyl-CoA. Tyto dvě

makroergické sloučeniny kondenzují na acetoacetyl-CoA za přítomnosti  $\beta$ -ketothiolázy (PhaA). Produkt potom podstupuje redukci NADPH-dependentní reduktázy (PhaB), což vede vždy k produktu (R)-izomeru 3-hydroxybutyryl-CoA. Tento produkt je substrátem PHA syntetázy (PhaC) a polymerizován na konečný poly(3-hydroxybutyrát) [7]. Vznikající hydrofobní řetězce se shlukují do celků, kde na sobě mají kovalentně navázanou PhaC syntetázu. Přesný mechanismus, dle kterého vzniká lipidická membrána s integrovanými proteiny, není zcela objasněn. Jsou možné dva způsoby micelární model nebo pučící model [8]. Celý postup biosyntézy poly(3-hydroxybutyrátu) je uveden na obr.1.3.

#### 1.1.4 *Cupriavidus necator*

Nejprozkoumanější bakterie produkující PHB, je námi použitá kultura *Cupriavidus necator* (H16, nebo starší název *Ralstonia eutropha*). Tato bakterie je gram-negativní přísně fakultativní chemolitoautotrofní, která se nejčastěji vyskytuje v půdě nebo ve sladké vodě. Při nedostatku kyslíku v prostředí, může bakterie přejít na denitrifikaci přes dusičnany jako alternativní akceptor elektronů. Organický uhlík a zdroje energie pro růst jsou získávány z různých cyklů včetně TCA cyklu a jeho mezi-produktů, cukry, mastné kyseliny, aminokyseliny, alkoholy a aromatické sloučeniny. Využívání cukrů je omezeno jen na fruktózu a N-acetylglukosamin. Tuhle fruktózu odbourává přes Entner-Doudoroffovu dráhu. V nedostatku organických metabolitů, bakterie přepne na autotrofní metabolismus, kde je  $CO_2$  redukován v Calvin-Benson-Basshamova cyklu a vodík oxidován za katalýzy dehydrogenáz. Na základě informací z kompletní sekvence nukleotidových párů, bylo umožněno blíže určit fyziologické a biochemické vlastnosti bakterie, na základě její metabolické kapacity [10]. Dále byl použit mutant PHB<sup>-4</sup>, který je geneticky modifikován a není schopen akumulovat poly(3-hydroxybutyrát). Množství PHB v mutantovi je přibližně 2 %. Množství polymeru a velikost granul závisí na rozličných kultivačních podmínkách a druhu kmenu.



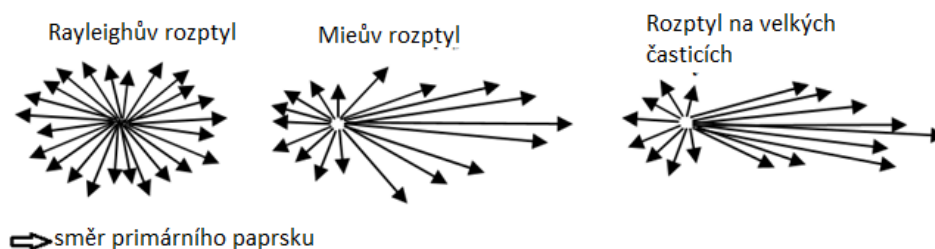
Obr. 1.4: Transmisní elektronový mikrograf tenké vrstvy *R. eutrophy* obsahující velké množství granul [7].

## 1.2 Rozptyl světla

Rozptyl elektromagnetických vln systémem je zapříčiněn heterogenitou tohoto celku: heterogenity na molekulové úrovni, nebo na úrovni agregátů vícero molekul. Bez ohledu na typ heterogenity, základní princip rozptylu je pro všechny systémy stejný. Hmota je složená z diskrétních elektrických nábojů: elektrony a protony. Elektromagnetická vlna je definována jako periodická změna elektrického a magnetického pole. V elektrickém poli mají molekuly tendenci se polarizovat – vzniká indukovaný oscilující dipól, jehož dipólový moment je závislý na frekvenci elektromagnetického záření. Vzhledem k velikosti a setrvačnosti jader se změna dipólu projevuje jenom oscilací elektronů. Každý oscilující elektrický dipól je ze zákonů elektrodynamiky zdrojem elektrického pole, šířící se náhodnými směry jako vlnění, o téže kmitočtu, jako primární záření. Navíc vyzáření elektromagnetické energie může proběhnout transformací na jinou formu energie, např. na termickou energii. Tento proces se nazývá absorpce [11, 12].

### 1.2.1 Elastický rozptyl světla

Pokud dojde k rozptylu bez ztráty energie, kde vlnová délka primárního světla je stejná, jako vlnová délka rozptýleného světla, mluvíme o elastickém rozptylu. Tuto teorii nejvíc rozšířil Rayleigh a Mie. Pokud dochází ke ztrátě energii, tudíž rozptýlené světlo má menší energii, jako budící elektromagnetická vlna, jedná se o kvazielastický rozptyl. Při Rayleighově teorii se světlo rozptyluje na částicích menších než je budící světlo. Nejvíce se světlo rozptyluje na částicích, kterých rozměr není větší než dvacetina vlnové délky. Například vlnová délka 400 nm se bude nejlépe rozptylovat na částicích o rozměru 20 nm. Tento rozptyl můžeme označit jako bodový. Tyto dipóly oscilují stejnou frekvencí jako použité pole a proto rozptylují sekundární světlo do všech směrů. Celkové elektromagnetické pole rozptylu je získáno superpozicí všech rozptýlených vln, kde je třeba zohlednit fázový rozdíl. Ve všeobecnosti fázové vztahy se mění pro rozdílné směry rozptylu. Pro malé částice v porovnání s vlnovou délkou primárního světla, všechny sekundární vlny jsou přibližně ve stejné fázi, proto se intenzita rozptylu nemění se směrem rozptylu. Jako uvedl ve své teorii Gustav Mie, pro větší částice tyto závislosti jsou složitější, rozptyl není už bodový a už dochází k interferenci rozptýleného světla. V koloidních systémech se častěji setkáváme s částicemi rozměrem porovnatelným s primárním světlem. Množství možností pro vzájemné zesílení nebo zeslabení rozptýlených elektromagnetických vln se zvyšuje. Na velkých částicích je nejmenší odčítání vln, když jsou ve stejné fázi. Toto je patrné na obr. 1.5. Závislosti jsou pak složitější, v rozptylovém modelu je víc píků. Fázové posuny jsou nejvíce závislé na geometrii částice, směru rozptylu, velikosti a tvaru. Ale amplituda a fáze indukovaného dipólového momentu pro danou frekvenci závisí na materiálu, z kterého je částice složená. Fundamentální problém je měření rozptylu světla ve složitých systémech, kde se už nejedná o rozptyl jediné částice. Částice jsou elektromagneticky spárované: každá je excitovaná vnějším polem a výsledné pole je rozptýlené jinými částicemi. Dochází často k mnohonásobnému rozptylu světla v hustých systémech, kde se rozptyluje sekundární paprsek na částicích [11, 12].



Obr. 1.5: Porovnání Rayleighova rozptylu s rozptylem Mieovým, kde dochází k interferenci rozptýleného světla v různých směrech [13].



### 1.2.2 Rozptyl světla v koloidních soustavách

Závislosti pro intenzitu rozptýleného světla v disperzních systémech odvozené Rayleighem:

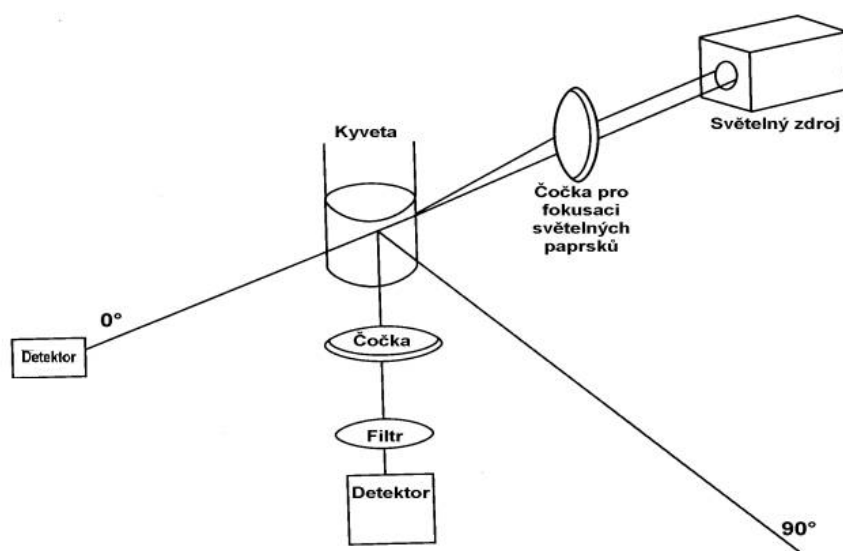
$$\frac{i_p(\theta)}{I_0} = \frac{\pi^2 \cdot \alpha_p^2 \cdot F(\theta)}{\epsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2}, \quad (1.1)$$

kde  $i_p(\theta)$  je intenzita bodového rozptylu světla pod úhlem  $\theta$  (úhel svírající primární paprsek s paprskem rozptýleného světla),  $I_0$  intenzita primárního záření,  $\alpha_p$  představuje polarizovatelnost částice,  $\epsilon_0$  permitivita vakua,  $\lambda$  vlnová délka budícího záření, při elastickém rozptylu  $I$  rozptýleného světla,  $r$  vzdálenost detektoru. Jako je vidět v rovnici 1.1, ke které došel lord Rayleigh, rozptyl světla je závislý na mnoha parametrech. Intenzita rozptylu je nepřímo úměrná čtvrté mocnině vlnové délky, proto UV a modrá složka budícího světla je nejvíce rozptylována. Tento úkaz je vidět na obloze, která je díky této závislosti modrá. Polarizovatelnost částic je další parametr na čem závisí intenzita rozptylu. Intenzita rozptýleného světla je přímo úměrná čtverci amplitudy, jelikož samotný indukovaný dipólový moment je závislý na amplitudě elektromagnetických vln šířících se z dipólu. Polarizovatelnost je funkcí velikosti částice a přírůstku indexu lomu s koncentrací. Důležitým aspektem při rozptylu je molární hmotnost. V disperzních systémech, kde se částice skládají z homopolymeru, tak se dipólové momenty indukované na částicích vnějším polem stávají aditivní, výsledný moment je úměrný počtu částic. To znamená, že je závislý i na celkové hmotě částice. Další faktor ovlivňující rozptyl světla je geometrické uspořádání. Intenzita je tedy závislá na vzdálenosti detektoru od kyvety, na rozptylovém úhlu, kde při Mieově teorii, rozptýlené světlo nemá ve všech směrech stejnou intenzitu. Dále je třeba brát v úvahu polarizaci primárního světla. Při částicích větších nebo porovnatelných s vlnovou délkou budícího světla, se proto zavádí takzvaný Rayleighův poměr, aby se eliminovalo geometrické uspořádání [11]. Pro měření rozptylu světla se nejčastěji využívá turbidita, kde se měří úbytek primárního světla v přímém úhlu. Tato metoda je pro naše nepřesná, jelikož turbidita je rozdíl řádově rozdílných hodnot. Navíc se při měření musí zohlednit i více aspektů podílejících se na úbytku intenzity, jako je třeba absorbance. Proto byla zvolena jiná metoda pro měření rozptylu a to nefelometrie.

### 1.2.3 Nefelometrie

Nefelometrie je analytická metoda založená na měření rozptylu světla v odlišném směru od primárního záření. Většinou se měří v kolmém směru od budícího paprsku. Rozptyl se měří na nefelometrech, které mohou být automatizovány. Skládá se ze světelného zdroje, který je nejčastěji helium neonový, argonový laser, nebo konvenčnější používají žárovku s halogenovou nebo xenonovou výbojkou. Pro tyto

přístroje je zapotřebí i monochromátor, jelikož světelný zdroj poskytuje polychromatické světlo. Detektor je obvykle fotonka nebo fotonásobič umístěný obvykle pod úhlem 70-90°. Na nefelometru se měří rozptyl světla na malých částicích, což způsobuje Tyndallův jev. Přístroje také dovolují sledovat rychlosti změny rozptylu světla – kinetiku, která je přímo úměrná rychlosti vzniku agregátů nebo komplexů. Citlivost této metody je přibližně  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Při nefelometrii je třeba si uvědomit, že rozptyl světla na částicích srovnatelnými nebo většími, než je vlnová délka je eliptický. Měří se nejčastěji pod úhlem 30°, protože osa elipsoidu je rovnoběžná se směrem primárního záření. V přímém úhlu má intenzita rozptylu svoje minimum. Využití nefelometrie je v biochemii časté při aglutinačních nebo vyčerovacích reakcích. Dále se používají nejčastěji v hematologii a v mikrobiologii při sledování růstu mikroorganismů [14].



Obr. 1.6: Porovnání turbidimetrie a nefelometrie jako metody pro měření rozptylu světla [14]

### 1.3 Luminiscence

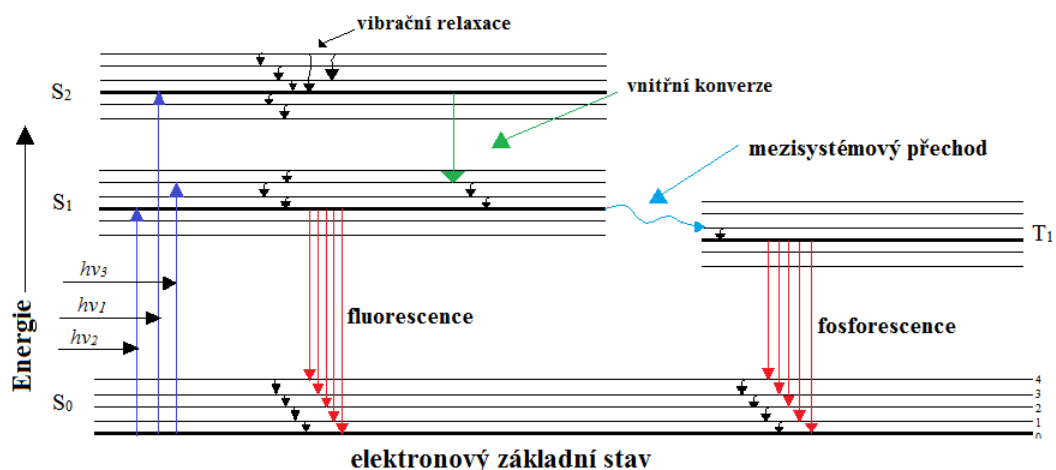
Luminiscence je emise světla, která probíhá z excitovaných elektronových stavů. Světlo může být emitováno z ultrafialové, viditelné nebo infračervené oblasti spektra. Pokud molekula získá energii, elektrony mohou být excitovány do vyšších elektronových stavů ze základních hladin, které mají nejnižší možnou energii molekuly. Dle způsobu excitace se luminiscence dělí na mnoho pododvětví, zahrnujíc světelnou absorpci (fotoluminiscence), excitaci teplem (termoluminiscence), nebo vyvolanou elektrickým polem (elektroluminiscence), tlakem (triboluminiscence) a mnoho

dalších. Emise světla vyvolaná chemickou, nebo biochemickou reakcí je (bio)chemiluminiscence. Pokud se elektronový obal molekuly nachází ve stavu, kdy jsou všechny elektronové spiny spárovány, tak mluvíme o singletovém stavu. V tomhle případě přechod elektronu z vyšších elektronových hladin (excitovaný stav) do základního stavu je znám jako fluorescence. Tento přechod probíhá v řádově  $10^{-10}$  až  $10^{-8}$  s. Na druhou stranu, emise světla po přechodu elektronu přes tripletový stav o nižší energii je označován jako fosforescence. V tomto případě pro tripletový stav se složky spinu dvojic elektronů v molekulovém orbitalu nekompenzují a celkový spin všech elektronů je jedna, kde elektron v excitovaném stavu má stejný spin jako elektron v základním. Jelikož je tento přechod kvantově zakázaný, je tudíž pomalejší jako fluorescence v řádově  $10^{-3} - 10^0$  s [15].

### 1.3.1 Jabloňského diagram

Zákonitosti při pohlcení energie molekuly jsou složité. Mezi excitací a deexcitací elektronu se, kromě výše zmíněných procesů, objevují s určitou pravděpodobností i jiné. Pro lepší znázornění se používá Jabloňského diagram viz obr.1.7. Nejprve dochází k absorpci záření molekulou na vyšší energetické hladiny daného elektronového stavu, která trvá řádově  $10^{-15}$  s. Absorpce probíhá přechodem vazebných nebo nevazebných elektronů v molekule do antivazebných orbitalů, kde při složitějších molekulách se jedná o kombinaci vícero přechodů. Po excitaci je více možností jak se dostat do termodynamické rovnováhy. Orbitály molekul mají navíc soubor vibračních a rotačních hladin. Rotační hladina je zapříčiněna volnou rotací molekuly, jelikož tato energie je kvantována, dosahuje určitých diskrétních hodnot. Vibrační hladina je kmitání samotných atomů obsažených v molekule. Vzdálenosti mezi vibračními a rotačními hladinami, jak lze vidět na obr.1.7, jsou menší jako elektronové. Molekula, na rozdíl od atomů, může být excitována širokou škálou vlnové délky fotonu, díky vibračním a rotačním hladinám, kde tato energie může být uložena. Následně po excitaci molekuly, elektron přechází vibrační relaxací, která trvá řádově  $10^{-12}$  s, na nejnižší možnou rovnovážnou vibračně-rotační hladinu příslušného elektronového stavu, kde systém má nejnižší možnou energii. Tato vibrační relaxace je způsobena přenosem energie z excitované molekuly do okolních molekul vibrací a rotací. Tento jev probíhá ještě před samotnou emisí světla. Následně dochází k vyzáření fotonu o nižší energii jako je primární záření – Stokesův posun. Existují i nezářivé přechody na základní hladinu, jako je vnitřní konverze, mezisystémový přechod, intramolekulární přenos náboje nebo konformační změna. Vnitřní konverze je předání tepelné energie excitovaného stavu do prostředí ostatním molekulám, kde se systém navrátí do základního stavu bez vyzáření fotonu. Mezisystémový přechod se uplatňuje pouze při fosforescenci a zpožděné fluorescenci, kdy dochází k obrácení

spinu elektronu a přechodu systému do tripletového stavu. Tato hladina má nižší energii jako singletový excitovaný stav, proto při zářivém přechodu (fosforescence) se vyzařený foton objevuje v delších vlnových délkách. To je zapříčiněno ztrátou energie při přechodu do tripletového stavu. Při zpožděné fluorescenci přechází z tripletového stavu nazpět do excitovaného singletového stavu odkud dochází k emisi. Po emisi světla a návratu elektronu do základního elektronového stavu se většinou nachází na vyšší vibračně-rotační hladině, odkud se vibrační relaxací vrací zpět do výchozího stavu  $S_0$  [16, 17].



Obr. 1.7: Jablonského diagram ilustrující procesy probíhající ve fyzikálních systémech při fluorescenci a fosforescenci

### 1.3.2 Franck-Condonův princip

Franck-Condonův princip popisuje pomocí kvantové chemie vibrační přechody při absorpci nebo emisi fotonu. Vibrace těžkých atomových jader molekul, při elektronovém přechodu, nejsou ovlivněny okamžitě. Hned po přechodu bude mít jádro stejnou hybnost jako předtím. Všeobecně, excitovaný elektronový stav není v rovnovážné poloze podle zákonů termodynamiky a proto začne molekula vibrovat. Při excitaci nebo deexcitaci elektronu dochází k minimálním změnám pozic jádra molekul a molekul prostředí, aby tyto zákony byly zachovány. V excitovaném a základním stavu má molekula rozlišný dipólový moment a polarizovatelnost, proto musí dojít k vyrovnání sil vibracemi s okolitými molekulami. Elektronový přechod z jednoho vibračního stavu do jiného je pravděpodobnější, jestli se vibrační vlnové funkce překrývají [18]. V důsledku zbavení energie molekuly hned po excitaci vibrováním a předáním tepelné energie do okolí, je energie budícího záření vyšší jako emitované

světlo. Tomuto jevu se říká Stokesův posun, což je rozdíl mezi maximem absorpčního a emisního pásu.

### 1.3.3 Charakteristiky fluorescence

Ve fluorescenčních měřeních pro získání charakteristických veličin a závislostí se nejčastěji setkáváme s absorpčním, excitačním a emisním spektrem, kvantovým výtěžkem a dobou života fluoforu. Dále lze uvést i polarizaci záření a fluorescenční anizotropii.

Emisní spektra jsou závislosti intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, kmitočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření. Jedná se o určitou distribuci pravděpodobnosti přechodů z rovnovážné vibrační hladiny do různých základních vibračních hladin  $S_0$ . Další vlastnost fluorescence je, že emisní spektrum je charakteristické pro každou molekulu, nehledě na vlnovou délku excitačního záření. Toto se nazývá Kashovo pravidlo. Po excitaci do vyšších elektronových a vibračních hladin, je nadbytek energie rychle rozptýlen do prostředí okolním molekulám. Fluofor se pak nachází v nejnižším vibračním stavu hladiny  $S_1$ . Tato relaxace trvá řádově  $10^{-12}$  s a je pravděpodobnější při hladinách, které se skoro překrývají a mají podobnou energii. Kvůli této rychlé relaxaci, je emisní spektrum nezávislé na vlnové délce primárního paprsku. Také existují fluofory, které existují ve dvou ionizačních strukturách. Pro každé pak platí jiné emisní a absorpční spektrum. Tyto spektra mají schopnost ovlivňovat prostředí. Mezi základní parametry patří teplota, tlak, polarita, vodíkové můstky, pH, viskozita, přítomnost iontů a zhášečů [16, 19].

Pro většinu organických molekul platí zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem. Je to způsobeno tím, že přechody elektronu (absorpce i emise) z určitých vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Zrcadlová symetrie se nevyskytuje u molekul, kde je rozdílné geometrické uspořádání atomových jader v excitovaném stavu, jako v uspořádání ve stavu základním [19].

Nejdůležitější charakteristikou fluoforu je doba života a kvantový výtěžek. Kvantový výtěžek je počet emitovaných fotonů v porovnání s počtem absorbovaných elektromagnetických kvant. Substance s největším kvantovým výtěžkem, vztaženo na objem, vykazují největší jas při emisi. Doba života určuje čas dostupný pro fluofor na interakci nebo difuzi v daném prostředí, tyto informace dostáváme z emisních spekter. V těchto měřeních se zaměřuje na procesy zodpovědné na návrat do základního stavu. Zejména, bodem zájmu je rychlost emise fluoforu ( $\Gamma$ ) a rychlost nezářivého přechodu do stavu  $S_0(k_{nr})$ . Obě konstanty snižují počet molekul v excitovaném stavu. Frakce, která se vrátí do základního stavu přes emisi, se odvodí ze vzorce pro kvantový výtěžek:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (1.2)$$

kde  $Q$  je kvantový výtěžek a  $\Gamma$  a  $k_{nr}$  jsou rychlostní konstanty. Při fluorescenčních experimentech se volí fluofoř, který má co nejvyšší kvantový výtěžek. Některé se blíží jednotkové hodnotě, ale jsou vždy nižší. Doba života je definovaná jako průměrná doba molekuly, která setrvá v excitovaném stavu, před tím jako se vrátí do základní hladiny. Všeobecně trvá tento pozorovaný jev okolo 10 ns. Doba života je definována jako:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (1.3)$$

Jelikož emise světla je náhodný proces, některé molekuly emitují kvantum okamžitě  $t = \tau$ . Doba života je průměrná hodnota času, který molekula stráví v excitovaném stavu. Molekuly, které obsahují těžší atomy jako je třeba jód, vykazují kratší dobu života a menší kvantový výtěžek [16].

Důležitý faktor, který ovlivňuje emisi světla je fluorescenční anisotropie. Při měření tento parametr dává informaci o velikosti, tvaru molekul a jejich flexibilitě nebo o povaze prostředí. Anisotropie je založená na principu fotoselektivní excitace fluofoř polarizovaným světlem. Molekuly s větší pravděpodobností absorbují fotony, které mají elektrické vektory kmitající paralelně s momentem přechodu fluofoř. Moment přechodu má definovanou orientaci. V isotropickém prostředí, jsou molekuly orientovány náhodně. Při excitaci polarizovaným světlem, se excitují přednostně molekuly, které mají absorpční dipólový moment přechodu v jedné rovině s elektrickým vektorem excitujícího záření. Tomuto se říká fotoselekce, kdy se excituje jen určitá část orientovaných fluofořů. Anisotropie také charakterizuje rotační difuzi molekuly, která ovlivňuje naměřené hodnoty. Tato difuze během doby života excitovaného stavu mění emisní dipólový moment molekuly. Měření tohoto parametru nám poskytuje teda informaci o relativní úhlovém posunutí fluofoř v čase mezi absorpcí a emisí. Okamžitý stav anisotropické odezvy fluorescenční sondy je vyjádřena Perrinovým vztahem:

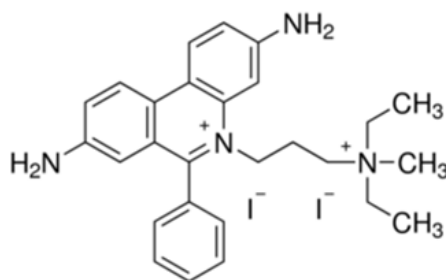
$$r = \frac{r_0}{1 + (\frac{\tau}{\theta})}, \quad (1.4)$$

kde  $r_0$  je anizotropie naměřená bez závislosti na rotační difuzi,  $\theta$  je rotační korelační čas pro difuzní procesy. Fluorescenční anisotropie se využívá při studiu různých interakcí molekul, které ovlivňují rotační difuzi [16, 20].

### 1.3.4 Fluorescenční sonda - propidium jodid

Pro fluorescenční měření byla zvolena fluorescenční sonda propidium jodid (PI). PI se váže na DNA interkalací mezi báze s malou nebo žádnou preferencí na určitou sekvenci. Jedna molekula barviva je na 4-5 párů bází DNA. PI se váže také na RNA, což znemožňuje při měření rozlišení mezi RNA a DNA. Při navázání sondy na nukleové kyseliny se zvyšuje intenzita a excitační maximum je posunuté 30-40 nm do červené

oblasti a emisní maximum je posunuté o 15 nm do modré oblasti. PI je viabilitní sonda, která není schopná proniknout skrze buněčnou stěnu, což při mrtvých buňkách s poškozenou membránou neplatí. Fluoror je tedy ukazatel mrtvých buněk. PI se interkaluje do DNA, tudíž záporný náboj DNA odpuzuje záporně nabitě molekuly a radikály-zhášec fluorescence. Systém není i tak fotostabilní před fotovybělováním, jelikož hlavní zhášec v systému je neutrální kyslík, který není zachycován a interaguje s excitovanými molekulami PI, které pak ztrácí schopnost fluoreskovat. PI se využívá ve fluorescenční mikroskopii, konfokální skenovací mikroskopii, průtokové cytometrii a fluorometrii [16, 24].



Obr. 1.8: Struktura molekuly propidium jodidu

### 1.3.5 Zhašení fluorescence

Intenzita fluorescence může být snížena širokou škálou procesů. Tohle zmenšení intenzity se nazývá zhašení. Zhašení může probíhat různými mechanismy. Nejčastěji se jedná o kolizní střet fluofooru v excitovaném stavu s molekulou v roztoku, která se nazývá zhášec. Při tomto setkání dochází k předání energie a molekula v excitovaném stavu se vrací do základní hladiny. Molekuly nemusí být po srážce nutně změněny. Velké množství molekul může v roztoku zhášet fluorescence. Nejběžnější zhášec je například kyslík, halogeny, aminy a elektronově chudé molekuly jako akrylamid. Mechanismy zhašení jsou odlišné pro každý fluorofoor-zhášecový pár. Pokud tento pár vytvoří nefluoreskující komplex, mluvíme o statickém zhašení. V biochemických systémech je znám fakt, že fluorofoor a zhášec musí být v kontaktu, aby zhašení proběhlo. Pak při vhodné volbě molekul lze určit vzdálenost mezi dvěma místy molekuly, popsat skládání proteinu a podobně. Existují i další důvody snížení intenzity fluorescence. Jeden z nich je koncentrační nebo samozhašení fluorescence. Při tomto jevu dochází k neelastické srážce excitovaných molekul s molekulami v základním stavu, v důsledku vysoké koncentrace fluofooru. Nadbytečná energie molekuly je disipována ve formě tepelné energie. V živých systémech, kde se nachází mnoho molekul, se setkáváme také s vyhasínáním, kdy emitované fotony jsou absorbovány barevným komponentem jako je třeba  $\beta$ -karoten [16, 21].

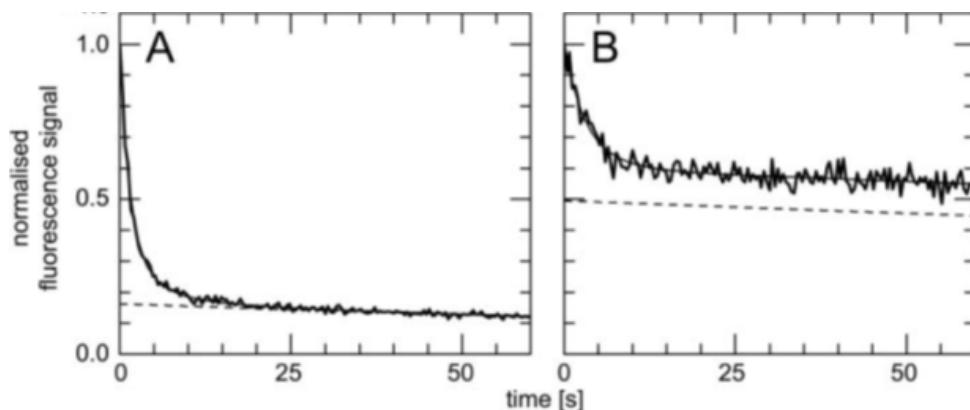
### 1.3.6 Fotovybělování(photobleaching)

Fotovybělování nebo-li blednutí je fotochemický proces, ve kterém fluorochrom vstupuje do repetitivních excitačně-emisních cyklů, které jsou permanentně přerušované destrukcí nebo nevratnou kovalentní modifikací fluorochromu reakcí s okolními (bio) molekulami. Oblast je vybělována periodicky, pokles intenzity světla je závislý na fotostabilitě použité fluorescenční sondy a její difuzí z nevyběleného prostředí. Fotodestruktivní a fotochemické procesy probíhají převážně tehdy, když se molekula nachází v temné tripletové excitované fázi, která má delší dobu života jako základní stav a zpomaluje velký stupeň chemické reaktivity, viz obr.1.7. Nejčastěji, reakce tripletového stavu s molekulárním kyslíkem, který je v tripletovém biradikálovém stavu (paralelní spin) v základním stavu, způsobuje transformaci na reaktivní singletní stav, singletní kyslík, který formuje superoxidový aniontový radikál a jiné reaktivní formy kyslíku. Tyto oxidující molekuly nevybělují fluorochromy, ale jsou také cytotoxické na buňky, protože ireverzibilně modifikují biomolekuly [21].

### 1.3.7 Kontinuální fluorescenční fotovybělování (CFM)

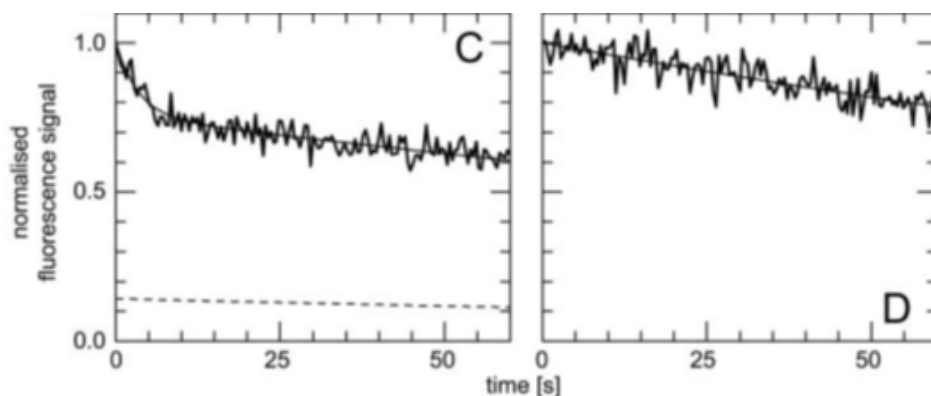
Kontinuální fluorescenční fotovybělování, nebo také kontinuální fluorescenční mikrofotolýza, je metoda, při které je místo v ohniskové oblasti mikroskopu osvětlována konstantním paprskem a zároveň je měřená fluorescence. Pozorovaný pokles intenzity světla, je výsledkem fotovybělovacího procesu, difuze, vázání fluorescenčních sond a membránový transport. V případě volné difuze, CFM křivka má tři rozlišitelné části. Na počátku při osvětlení vzorku, se projevuje nejvíc fotovybělování, po velmi krátký časový úsek. Pokud fluorescenční sonda je imobilní, tedy pevně navázaná na molekuly systému, bude v tomto čase vybělená. V druhé části křivky, fluorescenční gradient mezi běleným prostorem a okolím indukuje difuzi nových fluoroforů z okolí do vyběleného prostředí, což způsobuje zpomalení klesání intenzity fluorescence. Tato doba je charakterizována podmínkou, kdy časový rámec difuze a fotovybělování jsou přibližně rovné. V třetí části křivky se fluorescenční gradient rozšířil z infračervené oblasti daleko do prostředí, až nakonec dosáhl hranici difúzního prostředí. Z uvedených informací vyplývá, že první část křivky je nejlepší pro popsání řádu reakce fotobělení a imobilní frakce. Druhá část režimu je nejlepší pro určení difúzního koeficientu a třetí časový režim se může použít na získání informací o velikosti difúzního prostoru. Existuje vícero typů závislostí navázání fluorescenční sondy, kde asociační a disociační konstanty jsou menší, podobné, a větší jako rychlost bělení, ale vždy menší nebo podobné jako difúzní koeficient. Pro systémy, kdy je specifický fluofoor navázaný na makromolekulu živého systému, kde je fluorescenční sonda pevně navázaná a je minimum výměny molekul z okolí, platí křivka, která je na obr.1.9. Z obrázku je patrný exponenciální průběh funkce vyhasínací křivky. Tato





Obr. 1.9: Vyhasínací křivka pro speciální parametry, kdy pro A  $k_{off} = 0 \text{ s}^{-1}$ , bez výměny fluoforu z okolí a pro případ B  $k_{off} = 0,05 \text{ s}^{-1}$  [23]

závislost obsahuje oblast prudkého poklesu intenzity fluorescence, z důvodu imobilizace fluorescenční sondy ve vybělovacím prostoru. V případě, kdy se fluofor volně pohybuje v prostoru, pokud neinteraguje s okolitými molekulami a obsahuje také mobilní fázi, kde dochází k výměně fluoroforu, je pokles fluorescence méně patrný. Tento jev je vidět na obr.1.10. Je to způsobené tím, že do detekčního objemu přicházejí nové fluorescenční sondy. Proces fotovybělování bude tedy funkcí difúzního koeficientu. Ve všech případech fotovybělování vzniká produkt, který ztrácí schop-



Obr. 1.10: Vybělovací křivky pro fluofory s disociační konstantou pro C  $k_{off} = 0,2 \text{ s}^{-1}$  a pro D  $k_{off} = 6 \text{ s}^{-1}$  [23]

nost fluorescence. Pro názornost je uvedena fotochemická reakce buzená světlem:



kde  $C^*$  je excitovaný singletový stav fluoforu, který se může navrátit do základního stavu zbavení se energie emitací fotonu, nebo podstoupí nevratnou reakci vedoucí

k nefluoreskujícímu produktu. Po určitém čase se zvyšuje počet vybělených fluorescenčních sond a klesá na minimum. Tento čas je závislý na fotostabilitě použitého barviva, vlivu prostředí a intenzitě budícího světla [22, 23].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Klíčovým krokem řešení tématu bakalářské práce bylo se naučit pracovat s modelovým bakteriálním kmenem produkujících polyhydroxybutyrát a studování fotoprotektivních vlastností již zmíněného polymeru použitím různých fyzikálně-chemických technik.

### 2.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

#### 2.1.1 Použité bakterie

Při zkoumání vlastností v experimentální části byly použity kmeny bakterií, *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutant *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 byl získán z české sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně, zatímco bakteriální kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> zakoupený v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

#### 2.1.2 Použité chemikálie

- NutrientBroth, (Himedia)
- Agar, (Himedia)
- Síran amonný, (Lach-ner, ČR)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, (Lach-ner, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, (Lach-ner, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný, (Lach-ner, ČR)
- Fruktóza, (Lach-ner, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), (Lach-ner, ČR)
- Lysozym
- Chlorid sodný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Chlorid draselný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Chlorid hořečnatý, (Sigma Aldrich Inc.)
- Deoxyribonukleáza (DNáza I)
- Propidium jodid, (eBioscience)
- Chloroform, (VWR Prolabo Chemicals)
- Destilovaná voda

#### 2.1.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy, Boeco

- Fluorescenční korelační spektroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH
- UV-VIS spektrometr, Hitachi U-3900H
- Sušárna Binder FD53
- Spektrofotometr Helios DELTA
- Vortex, trepačka IKA
- Laminární box Aura mini, Bio Air instruments
- Orbital shaker-incubator E5-20
- Centrifuga, EBA Hettich
- Temperovaná třepačka, Heidolph UNIMAX 1010, Labicom s.r.o.
- Zvedáček laboratorní hliníkový
- Homogenizátor HD 3200
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z36HK
- Spektrofotometr AMINCO–Bowman Series 2
- Plynový chromatograf: GC-FID (Hewlett Packard, Series II 5890), Kolona-DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- pH metr Sensodirect 200, Lovibond
- Mikroskop L II ooA, Intraco Micro
- GKB Color Digital CCD kamera

## 2.2 Kultivace

### 2.2.1 Uchovávání bakteriálních kultur a příprava inokula

Jak bakteriální kmen *C.necator* H16, tak i *C.necator* PHB<sup>-4</sup>, byly dodány v lyofilizovaném stavu. Takto doručeny bakteriální kmeny byly dále preočkovány a oživeny na Petriho miskách obsahující pevné médium Nutrient Broth na agaru v termostatu při teplotě 30°C. Po kultivaci byly kultury uchovávány při teplotě 4°C. Nově připravené pevné médium v Petriho miskách se pravidelně opakovalo v intervalu jednoho měsíce.

Inokulum bylo připraveno do 100 ml Erlenmayerových baňkách s obsahem 50 ml živného média Nutrient Broth. Do vysterylizovaného inokula byly zaočkovány bakteriologickou kličkou bakteriální kultura ve sterilním prostředí laminárního boxu. Takto připravené inokulum bylo ponecháno na temperované třepačce při frekvenci třepání 180 rpm a teplotě 30°C po dobu 24 hodin. Následně bylo přidáno 5 obj. % inokula vzhledem k celkovému objemu, pro přípravu minerálního média.

### 2.2.2 Živná média

Pro uchování bakteriální kultury bylo použito pevné agarové médium Nutrient Broth o složení:

Tab. 2.1: Složení agarového média

Látka	Množství
Beef extract	$10\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
Pepton	$10\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
NaCl	$5\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
Agar	$20\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

Pro kultivaci bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16 a PHB<sup>-4</sup> bylo použito minerální produkční médium o složení:

Tab. 2.2: Složení minerálního média

Látka	Množství
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Fruktosa	20 g
*Roztok stopových prvků (viz. tab.2.3)	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 2.3: Složení \*roztoku stopových prvků

Látka	Množství
FeCl <sub>3</sub>	9,7 g
CaCl <sub>2</sub>	7,8 g
CuSO <sub>4</sub>	0,156 g
CoCl <sub>2</sub>	0,119 g
NiCl <sub>2</sub>	0,118 g
CrCl <sub>2</sub>	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

Narozdíl, sterilizace médií, která byla provedena po dobu 45 min v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem, sterilizace fruktózy byla uskutečněna s otevřeným ventilem po stejnou dobu.

### 2.2.3 Izolace PHB granulí z kmene *Cupriavidus necator* H16

Nejprve byly bakterie odděleny od média prostřednictvím centrifugace při otáčkách 5000 rpm při teplotě 4°C po dobu 15 min. Takto získané buňky byly dále rozuspendovány v 100 ml 50 mM Tris-HCl pufru o pH=8, obsahující 1 mM kyseliny ethylen-diamintetraoctové (EDTA) a 100 mg lysozymu. Suspenze byla ponechána inkubovat na třepačce, která byla temperovaná na 120 rpm při teplotě 40°C po dobu 3 hodin. Dále byla tato suspenze opět zcentrifugována při stejných podmínkách, supernatant byl slit a biomasa byla rozuspendována ve 100 ml 4°C destilované vodě. Suspenze byla ponechána v homogenizátoru při frekvenci 20 kHz po dobu 3 min, kdy byla nepřetržitě chlazena ledem. Po centrifugaci o stejných podmínkách, které byly zmíněny již výše, byly porušené buňky rozuspendovány ve 100 ml 50 mM fosfátového pufru (pH=7), který obsahoval 10 mM MgCl<sub>2</sub> a 1 mg deoxyribonukleázy. Takto připravená suspenze byla dále ponechána na třepačce temperované na 120 rpm při teplotě 40°C po dobu 3 hodin. Po poslední centrifugaci při totožných podmínkách, PHB granule byly rozuspendovány ve 20 ml 50 mM Tris-HCl pufru o pH=8 a byly dialyzovány na 15 hodin při pokojové teplotě, oproti 20 mM Tris-HCl pufru (pH=8).

#### Složení pufrů

Tab. 2.4: Složení PBS pufru

Látka	Množství
NaCl	8 g
KCl <sub>2</sub>	0, 2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0, 24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2, 897 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 2.5: Složení Tris-HCl pufru (pH=8):

Látka	Množství
Tris	6,05A g
Destilovaná voda	1000 ml
3 M kyseliny chlorovodíkové	Množství, dokud pH pufru nebylo 8

Udávané pH roztoku bylo ověřováno pomocí pH metru Sensodirect 200, Lovibond.

Tab. 2.6: Složení fosfátového pufru (pH=7,4):

Látka	Množství
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,761 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	13,8636 g
Destilovaná voda	1000 ml

## 2.3 Charakterizace rozptylových vlastností PHB granulí

### 2.3.1 Stanovení rozptylových vlastností bakteriálních kmenů a izolovaných granulí

Rozptylové vlastnosti bakteriálních kmenů *C.necator* H16 a  $\text{PHB}^{-4}$  a izolovaných granulí, konkrétně porovnávání rozptylu v závislosti na různé optické hustotě, byly charakterizovány na spektrofotometru AMINCO-Bowman Series 2. Byly připraveny kultury v minerálním médiu o složení uvedeném viz.postup2.2.2. Poté byla kultura *C.necator*  $\text{PHB}^{-4}$  a izolované granule zředeny na stejnou optickou hustotu, přibližně  $A=1,93$ . Absorbance byla změřena v UV-VIS spektrofotometru při 630 nm. Poté granule a kmen *C.necator*  $\text{PHB}^{-4}$  byly zředěny destilovanou vodou postupně 5, 10, 15, 20 a 25násobné množství. Kmen *C.necator* H16 byl rovnou zředěn destilovanou vodou 50, 100, 150, 200, a na 250násobné množství, kdy hodnoty při naředění 10-krát, při  $\text{PHB}^{-4}$  a granulách byly přibližně stejné, jako naředěná kultura H16 při stém naředění ( $A=0,25$ ). Poté byl změřen synchronní sken rozptylu v křemenné kyvetě v rozsahu od 250-800 nm.

### 2.3.2 Stanovení sedimentační řady bakteriálních kmenů a izolovaných granulí

Při stanovení tendence bakterií sedimentovat byly použity vzorky připravené ředěním viz.kap.2.3.1. Byly postupně změřené absorbance v intervalu 5 minut, kdy hodnota byla zaznamenána každou minutu na UV-VIS spektrofotometru při 630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

### 2.3.3 Stanovení počtu buněk bakteriálních kultur *Cupriavidus necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

Stanovení počtu buněk v bakteriálních kulturách bylo provedeno pomocí desítkového ředění. Při ředění byly použity mikrozkušavky Eppendorf, do kterých bylo napipetováno 0,9 ml PBS pufru. Poté bylo napipetováno 0,1 ml z připravené bakteriální kultury do první mikrozkušavky obsahující 0,9 ml (ředění 1:10  $10^{-1}$ ). Na vortexu byl obsah dobře promíchán a poté bylo odebráno 0,1 ml do 2.zkušavky (ředění 1:100  $10^{-2}$ ). Takto byly kultury ředěny až do konečného ředění a to 1:1000 ( $10^{-3}$ ). Zároveň byl stanoven počet buněk pomocí Bürkerovi komůrky, kdy bylo odebráno dostatečné množství ze třetí zkumavky. Takto připravená B.komůrka byla vložena pod mikroskop a byly spočítány buňky v soustavě velkých čtverečků. Buňky byly počítány po uběhnutí 5 min.

### 2.3.4 Stanovení obsahu PHB v biomase

Pro stanovení obsahu bylo odebráno 10 ml kultury v minerálním médiu a 10 ml zředěných granul a poté byly centrifugovány při otáčkách 5000 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl slit a jednotlivé suspenze granulí a buněk byly rozuspendovány v 10 ml destilované vody a opět směsi byly podrobeny centrifugaci (5000 rpm 5 min). Zkušavky byly poté vysušeny v sušárně při teplotě 80°C. Po 12 hodinách bylo do vialek naváženo přibližně 10 mg suché biomasy. Poté byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly zateplovány a nechány při teplotě 90°C v termostatu 3 hodiny. Po esterifikaci byla směs ochlazená a extrahována v 0,5 ml NaOH o koncentraci 0,005 mol · dm<sup>-3</sup>. Po extrakci a vytvoření fázového rozhraní, bylo odebráno 0,05 ml spodní chloroformové frakce do nových vialek s obsahem 0,95 ml chloroformu. Tyto vialky byly poté uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie FID (plamenový ionizační) detektor.



## 2.4 Příprava vzorků pro Kontinuální fluorescenční mikrofotolýzu (CFM)

Byla odebrána suspenze s buňkami kmenů H16 a PHB<sup>-4</sup> o objemu 1 ml do mirkozku-mavek. Obsah byl zcentrifugován (5000 rpm 5 min). Supernatant byl slit a biomasa byla rozuspendována v 1 ml PBS pufru. Do suspenze bylo přidáno 5  $\mu$ l propidium jodidu o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>. Takto připraven vzorek byl uchován 30 minut při teplotě 30°C na třepačce. Poté byl vzorek nanesen do předem připraveného 3 % agarozového gelu, kde byly změřeny bodové vyhasínací křivky. Gel byl připraven smícháním 0,3 g agaru s 10 ml mili-Q vody a zahřátím gelu na teplotu 80°C.

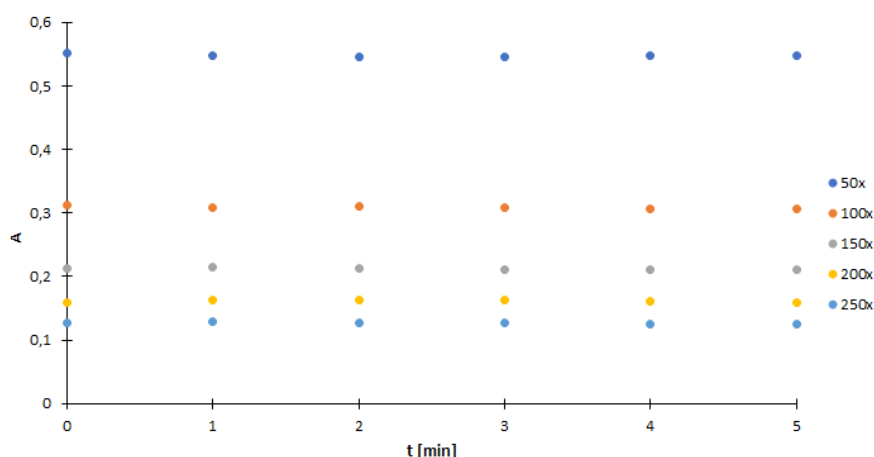
## 3 VÝSLEDKY STUDENTSKÉ PRÁCE

### 3.1 Charakterizace a optimalizace vlastností vzorků

Jedním z cílů této experimentální části bylo řádně charakterizovat připravené vzorky bakteriálních kultur *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> a izolované samotné granule v rámci sedimentace, stanovení počtu buněk a stanovení PHA v biomase.

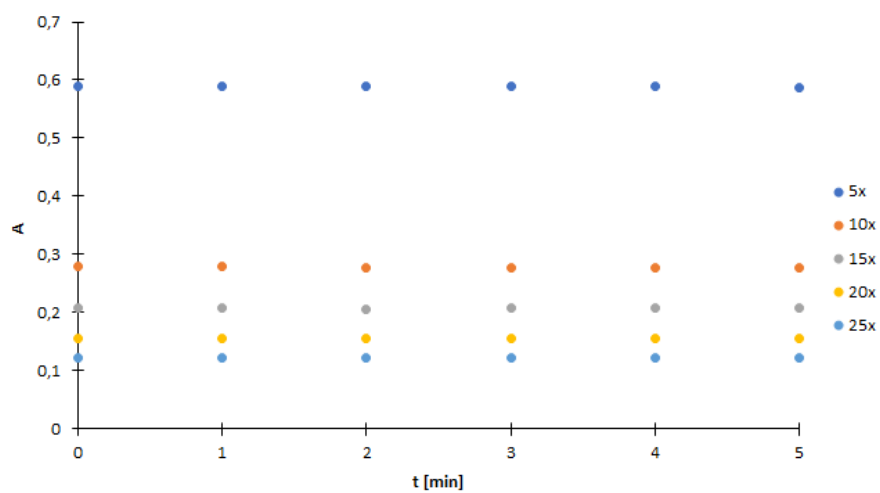
#### 3.1.1 Sedimentační řada

Cílem této části experimentální práce bylo zjistit v jaké míře rozuspendované buňky sedimentují. Při tomto experimentu byla stanovena absorbance při vlnové délce 630 nm u naředených vzorků připravených viz.2.3.1 Absorbance byla změřená každou minutu v průběhu 5 min.

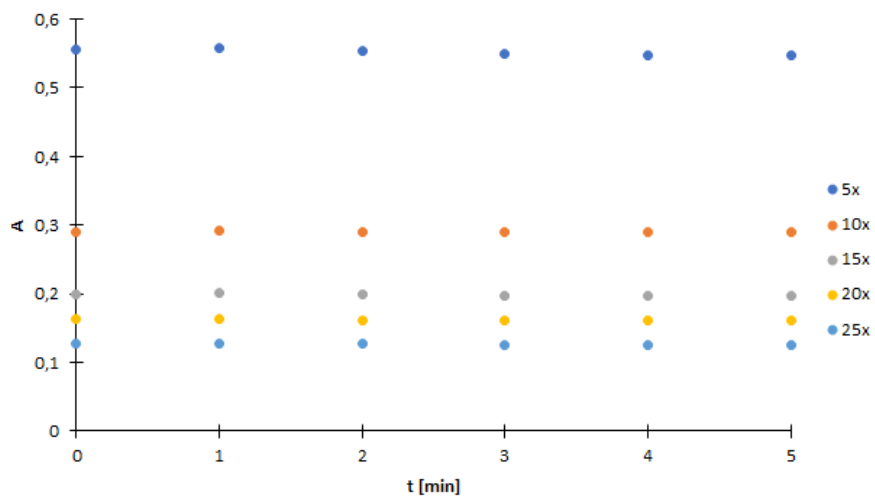


Obr. 3.1: Časová závislost absorbance suspenzí buněk *Cupriavidus necator* H16 o různé optické hustotě.

Jak jde vidět na Obr.3.1,3.2 a 3.3,se během celého měření absorbance v čase nijak výrazně nelišila. Její změna byla řádově  $10^{-3}$ , což je zanedbatelná hodnota. Z toho vyplývá, že sedimentační rychlosti vzorků v gravitačním poli je malá. Tudiž sedimentace neovlivňovala rozptylová měření, která jsou založená na porovnávání rozptylových vlastností jednotlivých suspenzí bakterií *C.necator* H16, *C.necator* PHB<sup>-4</sup> a suspenzí samotných izolovaných granulí. Proto bylo potřebné, aby naředené vzorky měly stejnou optickou hustotu, kde porovnávané naředené vzorky měly identickou absorbanci.



Obr. 3.2: Časová závislost absorpance izolovaných granul o různé optické hustotě.



Obr. 3.3: Časová závislost absorpance suspenzí buněk *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> o různé optické hustotě.

### 3.1.2 Počet buněk bakteriálních kultur *Cupriavidus necator*

Z důvodu bližší charakterizaci připravených vzorků na měření rozptylových závislostí porovnávaných bakteriálních kultur, se určoval počet buněk pod optickým mikroskopem s objektivem na Bürkerově komůrce, při stejném desítkovém naředení ( $10^{-3}$ ). Bakterie byly spočteny po uplynutí 5 minut, aby měly buňky čas nasedimentovat a jejich pohyb byl ve čtvercích minimalizován.

Tab. 3.1: Počet buněk v jednotlivých čtvercích pro bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

H16				PHB <sup>-4</sup>			
13	14	12	16	6	7	6	8
13	13	11	13	7	7	8	8
12	13	12	17	7	7	8	8
11	13	14	14	9	7	7	9

Výpočet počtu buněk v 1 ml kultury (x) bylo určeno ze vztahu:

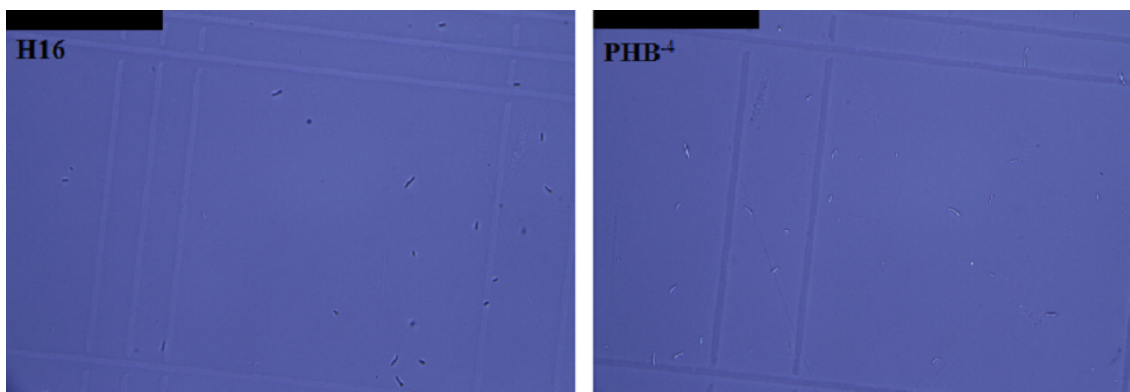
$$x = MO \cdot z \cdot X \cdot 1000, \quad (3.1)$$

kde  $MO$  je průměrný počet buněk v jednom čtverci (součet celkem spočítaných čtverců děleno jejich počtem),  $z$  je použité zředění,  $X$  je přepočet na  $1 \text{ mm}^3$  ( $X = 250$ , který odpovídá velkému čtverci) a hodnota 1000 je přepočet na jeden mililitr.

Tab. 3.2: Výsledky počtu buněk kultur *Cupriavidus necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>

	Průměr počtu buněk	Počet buněk v 1 ml
H16	13, 19	$3,3 \cdot 10^9$
PHB <sup>-4</sup>	7, 44	$1,8 \cdot 10^9$

Jak můžeme vidět v tab.3.2, počet bakterií *C.nacator* H16 je oproti jeho mutantnímu kmenu v průměru 1,8-krát větší. Samotný obsah a větší počet buněk vysvětluje ředění použité pro totožnou optickou hustotu měřených vzorků. Kultura H16 musela být více naředěná, pro možnost porovnání naměřených rozptylových závislostí.



Obr. 3.4: Snímek bakterií na Bürkerově komůrce

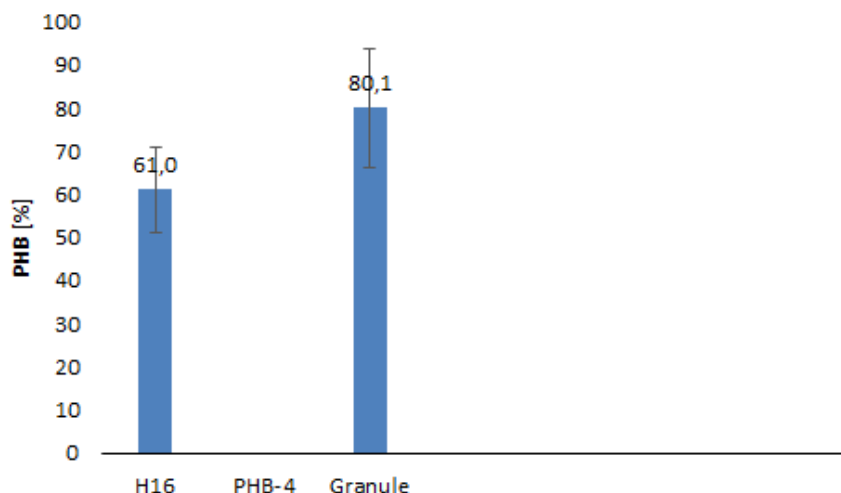
### 3.1.3 Stanovení PHA v biomase

Tato experimentální část se zabývá stanovením intracelulárním obsahem PHA v biomase bakterií *C.necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>. K tomuto účelu byly použity připravené vzorky postupem viz.kapitola 2.3.4. Kromě kultur se také stanovoval procentuální obsah PHA v izolovaných granulích. Zastoupení zkoumaného polymeru v sušině bakteriálního kmene *C.necator* H16 byl v průměru 61%. Zatímco v bakteriální kultuře *C.necator* PHB<sup>-4</sup> obsah polymeru byl v řádu stopového množství, jelikož pík v daném čase pro polymer byl přítomný. To vysvětluje neschopnost mutanta akumulovat PHA. Zatímco výsledky samotných granulí potvrdili největší obsah (80,1%), kde kromě polymeru se nacházely i lipidy membrány a proteiny přítomné v granule.

Tab. 3.3: Procentuální zastoupení PHB v biomase

Vzorek	H16 [%]	PHB <sup>-4</sup> [%]	Granule [%]
A	54,9	-13,8	96,6
B	52,9	-15,4	62,3
C	75,1	-14,4	81,4
Průměr	61	-14,5	80,1
SMODCH	10	0,6	14

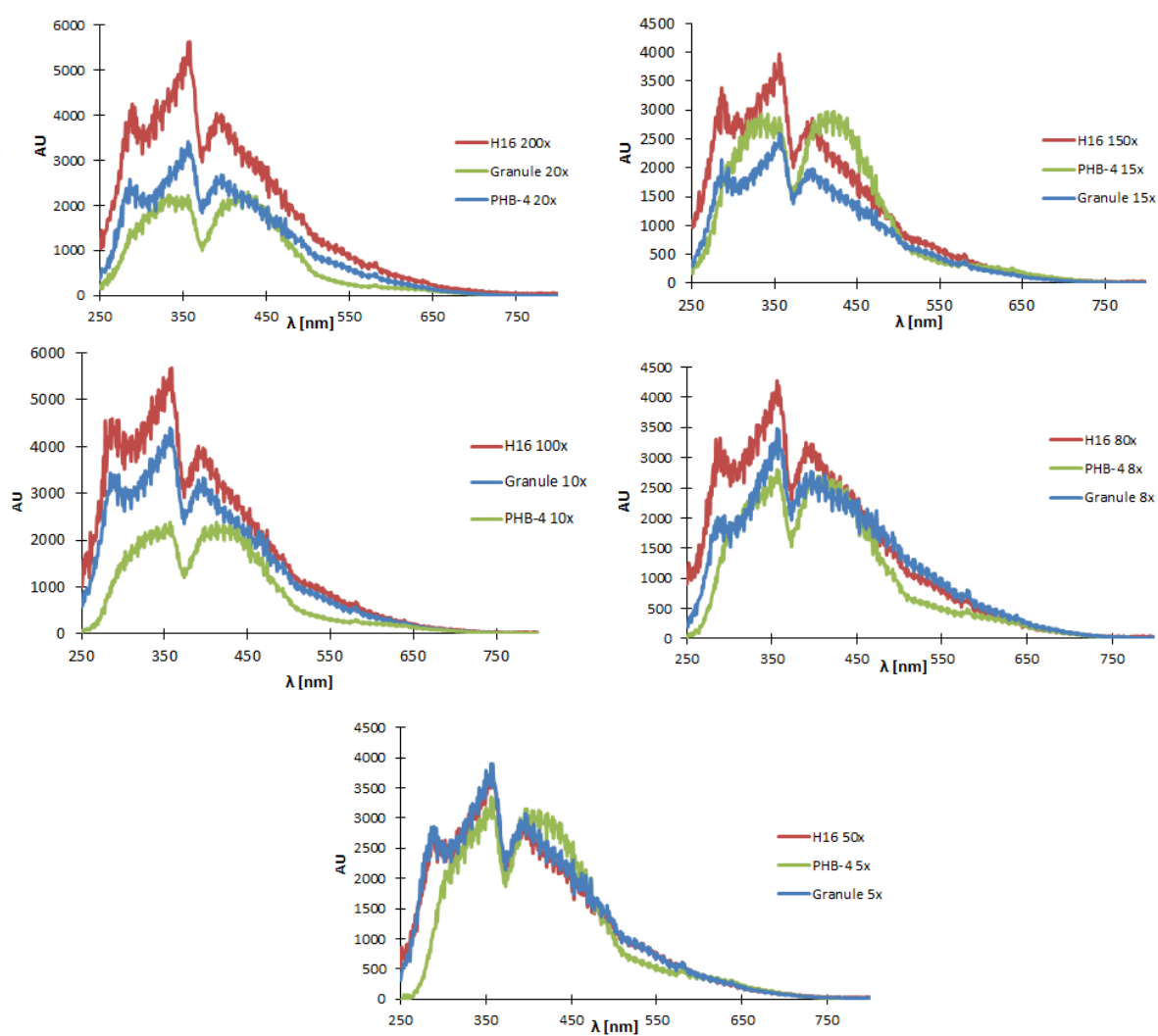
V tabulce 3.3 můžete vidět i záporné hodnoty odpovídající procentuálnímu zastoupení polymeru v kultuře PHB<sup>-4</sup>, které je způsobeno velkým rozdílem plochy píku pro bakterii a standartu. Skutečný podíl PHB byl malý a proto zanedbatelný.



Obr. 3.5: Obsah polyhydroxybutyrátu v biomase

## 3.2 Rozptylové charakteristiky

Tato experimentální část byla zaměřena na porovnávání intenzity rozptýleného světla bakterií obsahujících PHB granule, buněk bez polymeru a samotné granule v závislosti na různé vlnové délce primárního světla. Proměřené vzorky o různé optické hustotě byly připraveny a zředěny dle postupu viz.kapitola 2.3.1.Takto připravená optická hustota suspenzí byla dodržována z důvodu minimalizace rozdílů intenzity rozptylu vzorků, která se díky tomu řádově nelišila. Proto se nedají naměřené intenzity porovnat, jelikož koncentrace vzorků neodpovídala optické hustotě vzorků. Tyto hodnoty byly podmíněny přípravě měřených vzorků a mohly kolísat. Co se dá na tomto experimentu interpretovat je tvar naměřených závislostí. Křivka odpovídající bakteriální suspenze *Cupriavidus necator* H16 zobrazuje rozptyl samotné buňky, a navíc na rozdíl od PHB-4, se do závislosti započítal rozptyl polymeru agregovaného do granulí. Průběh křivky pro *C.necator* H16 a granule byl identický a charakteristický. Zatímco vzorek *C.necator* PHB<sup>-4</sup> měl jenom podobný průběh. Při všech závislostech se vyskytovala typická lokální maxima a to při 355, 410 a 465 nm. Tyto vlnové délky byly na bakteriích a částicích nejlépe rozptylovány. Největší maximum u vzorcích obsahující granule bylo 355 nm, což zodpovídá oblasti UV světla. Navíc při vlnové délce 290 nm měli jenom tyto vzorky lokální maximum, ve kterém se lišily od PHB<sup>-4</sup>. Tento rozptyl způsobují PHB granule, přítomné v oboou vzorcích. V případě křivky *C.necator* PHB<sup>-4</sup> můžete vidět na Obr.3.6 jako kdyby se jednalo o jeden celistvý pík se strmým propadem uprostřed při 375 nm. Tento propad byl přítomen ve všech případech, zahrnující jak bakterie produkující polymer tak i bakterie bez této schopnosti a dokonce i vzorky obsahující izolované granule. Tento jev byl pravděpodobně artefakt buněk a přítomných molekul, kde mohlo dojít i k



Obr. 3.6: Porovnání rozptylových vlastností bakteriálních kmenů *C.necator* H16,  $\text{PHB}^{-4}$  a izolovaných P3HB granul

absorpci, nebo to vyplývalo ze samotných rozptylových závislostí. Buňky *C.necator* PHB<sup>-4</sup> se dále lišily v tvaru křivky při nejmenších vlnových délkách, kdy intenzity byly malé, skoro nulové. Při těchto hodnotách bylo primární záření absorbováno. Naproti tomu křivky pro granule a bakterie H16 začínaly rozptylovat už při 250 nm a hodnoty intenzity byly řádově v tisících.

V nejméně zředěných vzorcích, s největší optickou hustotou, docházelo k vícenásobnému rozptylu. Primární světlo bylo rozptýleno na částicích vícekrát, paprsek neprošel přímo do detektoru, mluvíme o takzvaném samorozptylu. Jelikož se jedná o Mieův rozptyl, kde intenzita rozptylu světla není stejná ve všech směrech a ve směru kolmém na přicházející primární paprsek je nejmenší, dochází ke snížení intenzity. Tento jev je patrný v rozdílu hodnot intenzit vzorku zředěném 20 a 5-krát. A zároveň by mohl také eliminovat odlišnosti v intenzitě světla při malých zředěních, kde se křivky navzájem překrývaly.

Je zřejmé, že vzorky obsahující polyhydroxybutyrát, mají charakteristickou závislost rozptylu světla a největší míru intenzity. Rozptylované vlnové délky byly nejvíce v UV a fialové oblasti světla (380-450 nm), u delších vlnových délek je jenom nepatrné lokální maximum při 580 nm, přítomné ve všech vzorcích. Jinak křivky v této oblasti měly minimální hodnoty, blížícím se při 800 nm k nulové intenzitě rozptylu světla. Výsledky byly ověřeny statisticky sadou měření. Intenzity se při stejných podmínkách přípravě vzorků lišily, nemohly se proto porovnat. Pro bližší charakterizaci rozptylových vlastností je třeba porovnat s jinými typy experimentu, třeba integrační kouli, kde se eliminuje příspěvek absorbance při měření rozptylu v kolmém směru.

### 3.3 Kontinuální fluorescenční mikrofotolýza

V této experimentální části se vyhodnocovala data z Fluorescenčního korelačního spektroskopu, MicroTime 200, PicoQuant GmbH. Bakterie *C.necator* H16 obsahující polymerní granule a *C.necator* PHB<sup>-4</sup> s absencí polymeru, byly fotovybělovány při různých podmínkách metodou kontinuální fluorescenční mikrofotolýzy. Principem experimentu bylo změřit a porovnat fotostabilitu použitého barviva propidium jodidu inkorporovaného do nukleových kyselin v obou kulturách bakterií *C.necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>, které byly zalaty v 3% agarovém gelem pro zamezení pohybu buněk. U takto připravených vzorků byl měřen pokles intenzity fluorescence v závislosti na čase. Fluorescenční sonda v bakteriích byla fotovybělována, kdy se změnila na nefluoreskující produkt při fotochemické reakci a byl pozorován vliv obsahu PHB granulí na pokles intenzity v čase. Bylo předpokládáno, že živý systém s obsahem polymeru bude fotostabilnější, jelikož primární přicházející světlo je zčásti polymerem rozptý-



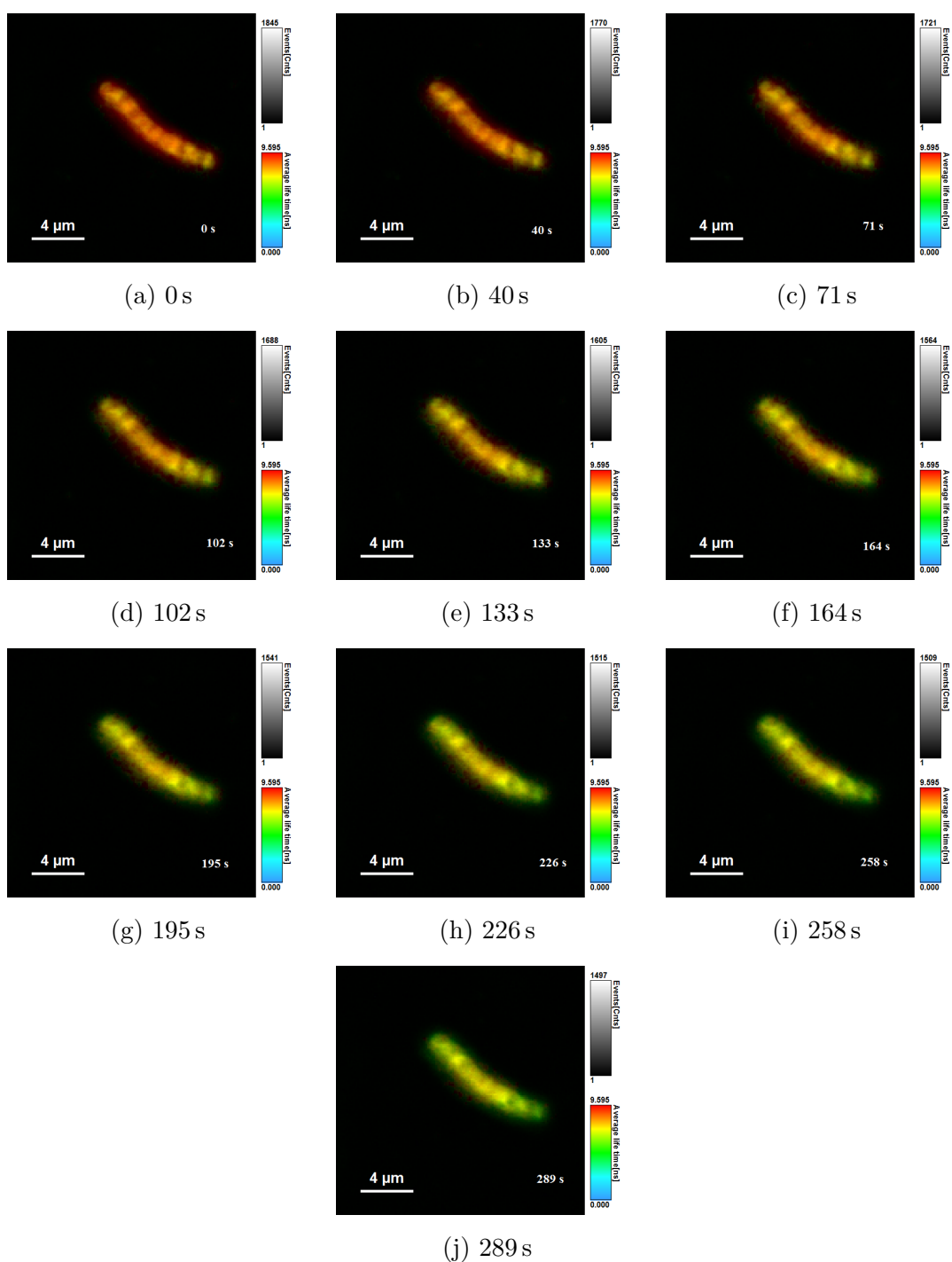
leno, absorbováno, nebo zachycuje molekuly a radikály vznikající vlivem působení UV světla, které reagují s excitovanou fluorescenční sondou. Pro samotné měření byly použity vlnové délky laseru 380 a 410 nm, kde excitační maximum propidium jodidu se nachází v středněvlnné UV oblasti a emise byla měřena v svém maximu použitím filtru v červené oblasti (620-760 nm).

První zvolenou variantou bylo skenovací fotovybělování, založené na ozáření celé roviny v níž se nacházela použitá bakterie *C.necator* H16 při vlnové délce 410 nm. Byl sledován pokles intenzity a průměrná doba života fluoforu v čase v celém objemu buňky. V rozmezí 290 s byly pořízeny snímky, přibližně jeden snímek po uplynutí 30 s, zobrazující i naměřené hodnoty.

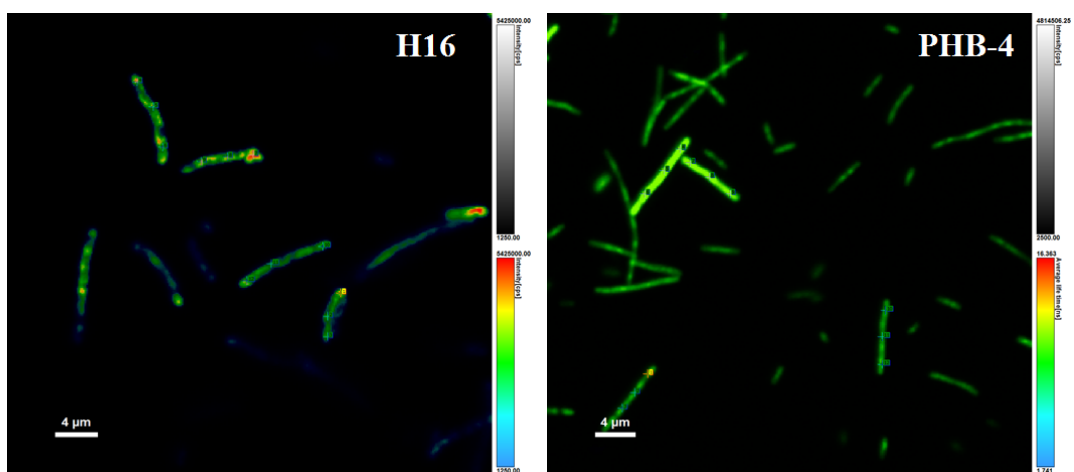
Při porovnání intenzity fluorescence na prvním a posledním mikroskopickém snímku viz.Obr.3.7, intenzita neklesla po dlouhém časovém úseku ani na poloviční hodnotu. I proto, tato metoda nemohla být použita na dokázání ochrany DNA P3HB granulemi před světlem, která by měla prodloužit čas vybělení buněk *C.necator* H16. Komplikací byl také pohyb bakterie mimo rovinu měření, který ovlivňoval intenzitu emitovaného světla. Co je evidentní je pokles času, kdy fluorescenční sonda je v excitovaném stavu-doba života fluoroforu, která klesla za 290 s na polovici. Tato hodnota nám velmi specificky hovoří o změně parametrů v prostředí buňky jako je pH, koncentrace iontů a kyslíku, nebo vázanosti molekul. Kvůli pohybu bakterií a zdánlivé fotostabilitě systému, kdy se nepodařilo buňku vybělit, se tento druh experimentu nemohl použít na porovnání bakteriálních kultur *C.necator* H16 a PHB<sup>-4</sup>. Nashromáždění statisticky ověřených veličin pro další interpretaci dat by bylo časově zdlouhavé a neekonomické.

Další měření, které bylo zvolené, bylo bodové fotovybělování propidium jodidu v bakteriích při vlnových délkách 380 a 410 nm. Byly zvoleny body na bakteriích viz.Obr.3.8 na kulturách H16 a PHB<sup>-4</sup>. Intenzita dopadajícího primárního světla se pohybovala okolo 10<sup>4</sup> kCnts. Principem experimentu bylo porovnávání doby, kdy intenzita fluorescence neklesla na polovinu svojí maximální hodnoty.

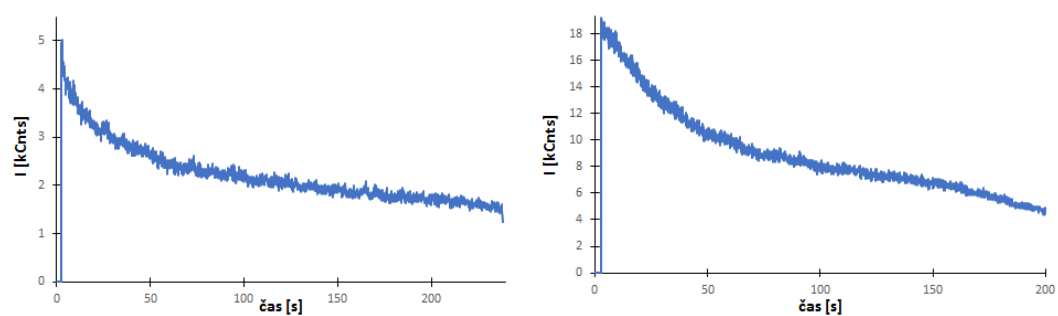
H16 by měla být fotostabilnější a tyto doby by měly být delší oproti PHB<sup>-4</sup>. Na grafech 3.9 a 3.10 jsou vidět různé průběhy a strmosti poklesu intenzity. Při porovnatelných křivkách H16 a PHB<sup>-4</sup> se bakterie obsahující polymer zdály fotostabilnější, kdy průměrný čas úbytku intenzity na polovinu se pohyboval okolo 64 s. Přičemž pro buňky PHB<sup>-4</sup> tento čas byl jenom 22 s. Tento rozdíl byl způsoben snížením intenzity primárního světla rozptylem a absorpcí, kde systém vydržel delší čas být vystaven světlu v fialové oblasti. Z důvodu úbytku intenzity primárního světla, se zmenšil počet excitovaných molekul, tím pádem pravděpodobnost fotochemické reakce akceptoru a donoru elektronu, což způsobovalo ztrátu schopnosti sondy fluoreskovat.



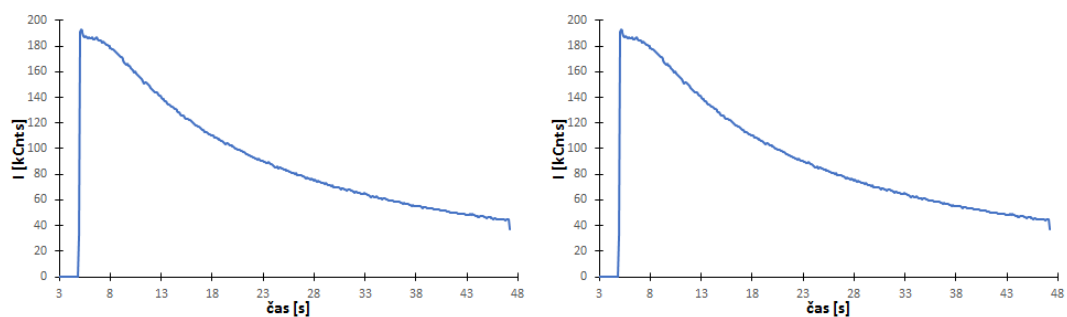
Obr. 3.7: Snímky bakterie *C.necator* H16 po fotovybělení celého objemu buňky.



Obr. 3.8: Zvolené místa v bakteriích při bodovém fotovybělování propidium jodidu



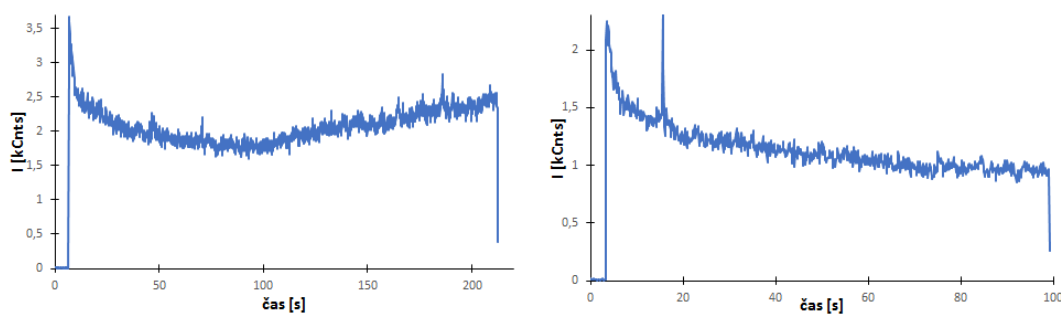
Obr. 3.9: Charakteristické vybělovací křivky pro bakterii H16



Obr. 3.10: Charakteristické vybělovací křivky pro bakterii PHB<sup>-4</sup>

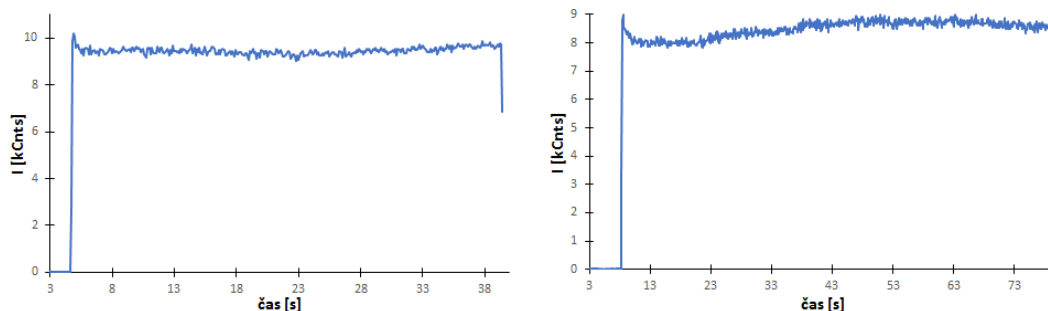
Problémem byl rovněž výskyt anomálií ve vybělovacích křivkách obou kultur. Někdy se zdál fotostabilnější systém buňky *C.Necator* PHB<sup>-4</sup>, kdy intenzita fluorescence v čase neklesala vůbec. Tento jev byl způsoben volným pohybem fluorescenční sondy v bakterii. Počet molekul, které byly vyběleny se rovnal počtu molekul přicházejících difúzí z okolního prostředí. Proto všechny CFM (Continuous fluorescence microphotolysis) měření byly závislé na určeném bodu, který byl fotovybělován a podmínkách v rozložení bakterii. V některých případech v kultuře H16 klesla intenzita příliš rychle, neboť DNA je v ní prostorově omezena. Jelikož většinu prostoru vyplňují granule, které zabraňují volnému pohybu celků jako je kruhová bakteriální DNA. DNA také může být imobilizována vazbou na polymerní shluky butyrátu, tudíž je přesně lokalizována v systému buňky. Při vybělování místa, kde se nachází jedna z kružnicové molekuly DNA a tudíž vysoká koncentrace propidium jodidu, byl počet vybělených molekul větší než počet fluoreskujících sond přicházejících difúzí a proto byl pokles intenzity větší, oproti buňkám *C.necator* PHB<sup>-4</sup>, kde docházelo k výměně mobilní frakce sondy difúzí, co pak ovlivňovalo intenzitu v běleném prostoru viz.Obr.3.11,3.12 . Na Obr.3.12 na druhém grafu můžete také vidět, že větší celek RNA nebo DNA přišel do fotobělené roviny, kde byl zaznamenán nárůst intenzity.

Problém pozůstával i ve výběru samotné fluorescenční sondy, která nediferencovala DNA od RNA. Pro dokázání ochrany genetické informace před UV světlem, je zkoumaná molekula DNA, protože RNA má krátkou dobu života a mutace nezpůsobují závažný problém pro existenci buňky. Tudíž je velmi pravděpodobné, že většina bělených bodů byla ribozomální RNA, která není předmětem našeho zájmu.



Obr. 3.11: Anomálie při měření CFM křivek v buňkách H16, vypovídající o složitosti systému bakterie s PHB granulemi a interpretaci dat

Při bližším zkoumání naměřených závislostí, se nabízí alternativní interpretace dat. Při CFM měřeních viz. 1.3.7 je charakteristický průběh křivky, který nám vypovídá o zastoupení frakcí ve systému. Pro závislosti bakterie *C.necator* H16 je průběh exponenciální, kde je zaznamenán prudký pokles intenzity na začátku bělení. Tato



Obr. 3.12: Anomálie při měření CFM křivek v buňkách PHB<sup>-4</sup>, vypovídající o složitosti systému bakterie bez granulí a interpretaci dat

část říká o imobilizované frakci sondy, která v tomto bodě ztrácí schopnost fluoreskovat. Další část křivky je ovlivněna už difuzí příchozích nových molekul sondy. Tyto výsledky tudíž poukazují na to, že v kultuře H16 je určitá část ribozomální RNA a DNA imobilizována. Avšak v bakteriích tento jev nebyl pozorován, DNA a RNA jsou uloženy volně v cytoplazmě. Nicméně některá data z předchozích měření dokazovala, že systém s volnou DNA a RNA se jevil tímto typem experimentem v některých případech fotostabilnější, oproti případu přesně lokalizované genetické informace v *C.necator* H16. Pro nesrovnalost naměřených dat, se nedá experiment interpretovat jako důkaz fotoprotektivních vlastností PHB granulí. Křivky byly naměřené i při 380 nm, kdy intenzita primárního světla byla řádově větší. Ale v datech se nenašla žádná závislost mezi hodnotami a měřeními, jelikož zvolená intenzita byla příliš velká. Časové intervaly, kdy klesla intenzita na půlku byly příliš nízké a rozdílné pro porovnání. Navíc po proměření rozptylových závislostí, při této vlnové délce se vyskytovalo lokální minimum, naměřené hodnoty nevypovídaly o předpokládané ochraně DNA rozptylem světla PHB granulemi. Výběr vyhodnocování naměřených dat nemusel zahrnovat veškeré závislosti, jiná analýza by mohla popisovat více informací o bakteriích. Pro ověření je nutno naměřit velkou sadu dat, aby se eliminoval výběr fotoběleného bodu bakterie, který ovlivňoval vybělovací křivky nejvíc, nebo navrhnout jiný typ experimentu.

## 4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit fotoprotektivní vlastnosti PHB granulí a navrhnout k ní dokazující fyzikálně-chemickou metodu. Konkrétně byly použity bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup>, které se liší ve schopnosti produkce a akumulace polymeru poly(3-hydroxybutyrátu) ve formě intracelulárních granul. Jelikož bakterie je modelovým příkladem metabolismu PHA, navíc existuje k ní mutantní kmen pro lepší porovnávání vlivu fotostresových faktorů na tyto mikroorganismy. Sledoval se také způsob protektivity genetické informace a samotné interakce PHB granulí s UV světlem. Jedním z dílčích cílů této bakalářské práce byla práce se samotnými bakteriemi. Dále navržení a optimalizace metody izolace PHB granulí z bakterie *Cupriavidus necator* H16.

Pro dokázání mechanismu ochrany DNA, byla použita nefelometrická metoda, díky které byly stanoveny rozptylové vlastnosti bakteriálních kmenů a izolovaných P3HB granul. Mutantní kmen *C.necator* PHB<sup>-4</sup> byl použit na porovnání a charakterizaci rozptylu světla samotné buňky bez granulí. Tudíž naměřené křivky kultur se lišily o přídavek rozptylu PHB agregátů. Tímto experimentem byl dokázáno rozptýlení světla na granulích a zobrazen typický průběh křivek. Lokální maxima přítomné ve všech závislostech byly při vlnových délkách 355, 410 a 465 nm. Navíc granule obsahující vzorky měly maximum i při vlnové délce 290 nm. Tyto vlnové délky dokazovaly interakci světla se zkoumanými agregáty v UV a modré oblasti. Rozptýlení by tak mohl být mechanismem ochrany a samotné interakce se světlem.

Zdá se, že schopnost akumulace P3HB navyšuje odolnost vůči UV světlu. V této práci byl použit konfokální mikroskop a metoda kontinuální fluorescenční mikrofotolýzy na dokázání fotostability. Fotovyblování skenováním celé buňky bylo příliš pomalé a nedostatečné a systém se zdál fotostabilní. Experimentální část se věnovala bodovým fotovyblováním náhodně vybraných míst v modelových kmenech, kde se porovnávaly doby poklesu intenzity na poloviční hodnoty. V některých případech se *C.necator* H16 zdála stabilnější, což dokazovala doba vyhasínání 63 s. V případě *C.necator* PHB<sup>-4</sup> tento čas byl o třetinu menší. Experiment dokazoval také typický průběh vyhasínací křivky, trochu rozdílný pro oba kmeny. Z těchto závislostí vyplývala interakce nukleových kyselin s granulemi. Typický průběh křivky vyhasínání imobilizované fluorescenční sondy, dokazoval navázání nebo prostorově omezení nukleových kyselin granulemi. Část měření ukazuje negativní efekt ochrany, kde byl omezen pohyb DNA a zvýšena pravděpodobnost fotochemické interakce této molekuly. Avšak experiment se nedal použít na dokázání případné fotoprotektivity, kvůli složitosti podmínek a v neshodách jednotlivých měření. Pro další měření bakteriálních kultur na konfokálním mikroskopu byla optimalizována metoda při

uchycování a imobilizování buněk v agarovém gelu.

Fotoprotektivní mechanizmy PHB granulí jsou komplexní jev, kde na jejich dokázání třeba vzít v potaz také vliv akumulace PHA na morfologii buněk, zorganizování komponent a molekul, nebo fyzikálně-chemické vlastnosti cytoplazmy, při vystavení systému UV světlem. V rámci bakalářské práce byly techniky úspěšně optimalizovány a modifikovány, i samotné přípravy nebo předúpravy vzorků. Testované techniky se stanou vhodným metodickým aparátem v navazujících experimentech. Tyto experimenty můžou být zaměřené zejména na konkrétních mechanizmech interakce světla a studovaných mikrobiálních systémech.

## LITERATURA

- [1] SOMLEVA, Maria N., Oliver P. PEOPLES a Kristi D. SNELL. PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. *Plant Biotechnology Journal*. 2013, roč.11, č.2, s.233-252. ISSN 14677644. DOI: 10.1111/pbi.12039.
- [2] LEE , S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates . *Biotechnol. Bioeng.* 1995 , 49 , 1 – 14
- [3] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, 87(2), 137-146 [cit. 2017-02-19]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [4] MICHAEL C.FLICKINGER, [edited by] Michael C.Stephen W.Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, biocatalysis, and bioseparation [online]. New York:J.Wiley,1999. ISBN 978-159-1244-578
- [5] MIKOVÁ, Gizela a Ivan CHODÁK. Vlastnosti a modifikácia Poly(3-hydroxybutyrátu). *Chemické listy*.2006, no.100,pp.1075-1083
- [6] Peoples OP, Sinskey AJ. 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J Biol Chem* 264:15298–15303.
- [7] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, no. 25, pp. 1503-1555. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670000000356>
- [8] BEEBY M, Cho M, Stubbe J, Jensen GJ. 2012. Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* 194:1092–1099. 10.1128/JB.06125-11
- [9] GRAGE, Katrin, Anika C. JAHNS, Natalie PARLANE, Rajasekaran PALANISAMY, Indira A. RASIAH, Jane A. ATWOOD a Bernd H. A. REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009-04-13, roč. 10, č. 4, s. 660-669. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm801394s. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801394s>



- [10] RAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, vol. 16, 1-2, pp.38-52 . Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000142893>.
- [11] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205s. ISBN 978-80-7080-674-6
- [12] CRAIG F. BOHREN a DONALD R. HUFFMAN. *Absorption and scattering of light by small particles*. Weinheim, Germany: Wiley, 2004. ISBN 3527618163.
- [13] ALKHOLIDI, Abdulsalam Ghalib a Khaleel Saeed ALTOWIJ. Free Space Optical Communications — Theory and Practices. *Contemporary Issues in Wireless Communications* [online]. InTech, 2014 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.5772/58884. ISBN 978-953-51-1732-2. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/contemporary-issues-in-wireless-communications/free-space-optical-communications-theory-and-practices>
- [14] ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, 14.35: 3. Dostupný z <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>
- [15] JAN F., Rabek. *Photochemistry and Photophysics*, Zväzok 3. 1991, 216 s. ISBN 0849340438.
- [16] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006, 954 p. ISBN 03-873-1278-1
- [17] KASHA, Michael. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society* [online]. 1950, 9, 14-. DOI: 10.1039/df9500900014. ISSN 0366-9033. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=df9500900014>
- [18] CONDON, Edward. A Theory of Intensity Distribution in Band Systems. *Physical Review* [online]. 1926, 28(6), 1182-1201. DOI: 10.1103/PhysRev.28.1182. ISSN 0031-899x. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.28.1182>
- [19] FIŠER Zdeněk: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 1. Lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze [online] 11.2.2009, Dostupný z [www:http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskope-v-neurovedach](http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskope-v-neurovedach). ISSN 1803-6619

- [20] CHOVELON, Benoit, Emmanuelle FIORE, Patrice FAURE, Eric PEYRIN a Corinne RAVELET. A lifetime-sensitive fluorescence anisotropy probe for DNA-based bioassays: The case of SYBR Green. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, 90, 140-145 DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.049. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316311988>
- [21] ISHIKAWA-ANKERHOLDD C., Hellen, Richard ANKERHOLD a Gregor P.C. DRUMMEN. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* [online]. 2012(17), 4047-4132. DOI: 10.3390/molecules17044047. ISSN 1420-3049.
- [22] PETERS, Reiner. Fluorescence Photobleaching and Photoactivation Techniques. *Fluorescence Microscopy* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013, s. 215. DOI: 10.1002/9783527671595.ch6. ISBN 9783527671595. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527671595.ch6>
- [23] WACHSMUTH, Malte, Thomas WEIDEMANN, Gabriele MÜLLER, Urs W. HOFFMANN-ROHRER, Tobias A. KNOCH, Waldemar WALDECK a Jörg LANGOWSKI. Analyzing Intracellular Binding and Diffusion with Continuous Fluorescence Photobleaching. *Biophysical Journal* [online]. 2003, 84(5), 3353-3363 [cit. 2017-04-11]. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)70059-9. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349503700599>
- [24] *Molecular probes: Propidium Iodide Nucleic Acid Stain* [online]. 2006 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.igb.illinois.edu/sites/biotec.uiuc.edu/files/upload/Ioduro>